

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E TRANSMISSÃO
DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* EM
SEMENTES DE ALGODÃO**

ANDRÉIA IRACI TUMELERO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2012

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E TRANSMISSÃO
DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* EM
SEMENTES DE ALGODÃO

ANDRÉIA IRACI TUMELERO

Orientadora: Dra Norimar D'Ávila Denardin

Coorientadora: Dra Elene Yamazaki Lau

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2012



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOPATOLOGIA



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Detecção, quantificação e transmissão *Xanthomonas citri* subsp.
malvacearum em sementes de algodão”

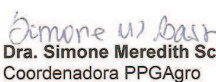
Elaborada por

ANDRÉIA IRACI TUMELERO

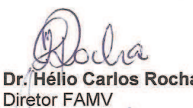
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutor em Agronomia – Área de Fitopatologia”

Aprovada em: 27/04/2012
Pela Comissão Examinadora

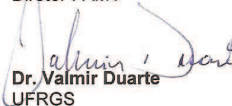

Dra. Norimar D'Ávila Denardin
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coordenadora PPGAgro


Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira
Fepagro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Elene Yamazaki Lau
Embrapa Trigo


Dr. Valmir Duarte
UFRGS


Dr. Erlei Melo Reis
UPF/FAMV

CIP – Catalogação na Publicação

- T925d Tumelero, Andréia Iraci
Detecção, quantificação e transmissão de xanthomonas citri
subsp. malvacearum em sementes de algodão / Andréia Iraci
Tumelero – 2012.
131 f.: il. color. ; 25 cm.
- Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2012.
Orientadora: Dra Norimar D'Ávila Denardin
Coorientadora: Dra Elene Yamazaki Lau
1. Algodão – Doenças e pragas. 2. Algodão - Sementes.
3. Algodão – cultivo. 4. Algodoeiro. I. Denardin, Norimar
D'Ávila, orientadora. II. Lau, Elene Yamazaki, coorientadora
III. Título.

CDU: 633.51

Catalogação: Bibliotecária Daniele Rosa Monteiro- CRB 10/2091

“Creio que sempre é tempo de abrir cativeiros. Ou para que o outro saia ou para que nós saíamos. A qualidade da nossa vida depende da qualidade de nossas relações. Reorientar a conduta, sobretudo quando identificamos desvios que nos levam para longe de nós mesmos, é a atitude mais sábia que podemos adotar. Reassumir a capacidade e voltar à posse do que somos e conseqüentemente dar ao outro o melhor que podemos oferecer é um jeito interessante que temos de humanizar-nos ainda mais. Humanidade é um processo a ser construído. Somos mais humanos à medida que somos livres, resgatamos os cativos e lhes devolvemos o direito de serem livres também.... há muitos cativeiros a serem abertos. Há muitas prisões a serem quebradas”.

Do livro: *Quem me roubou de mim?* – Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo, meu Orientador, que guia e conduz a minha vida, a Ele toda Honra Glória e Louvor.

Agradeço,

À Universidade de Passo Fundo, em especial a FAMV que proporciona todo suporte de instalação com laboratórios bem equipados para o desenvolvimento dos trabalhos.

À minha orientadora Dra Norimar D. Denardin, a mentora desse estudo, por ter confiado esse trabalho em minhas mãos e me apoiado mais uma vez, pela sua incontestável amizade e carinho. Por sua dedicação e apoio durante os trabalhos.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Agronomia que se empenharam na orientação dos estudos fazendo parte da minha formação profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa. Às Empresas e Universidades que contribuíram para o desenvolvimento do projeto, a Embrapa Algodão na pessoa do professor Luiz Chitarra, ao melhorista Paulo Aguiar da Fundação MT, ao fitopatologista Nelson Dias Suassuna da Embrapa Algodão de Goiás. A Universidade Federal de Lavras, ao departamento de Fitopatologia, especialmente ao laboratório de bacteriologia coordenado pelo professor Ricardo

Magela que permitiu acompanhar os experimentos desenvolvidos no laboratório. Agradeço também pela oportunidade de cursar disciplinas construir amizades; agradeço a Dra Suzete Destéfano do Instituto Biológico de São Paulo, que mesmo sem conhecê-la forneceu esclarecimentos via email e telefone.

À minha família, meu porto seguro. Minha irmã Carmen que é um anjo nas várias vezes de angústia e desânimo. Sempre foi mais que uma irmã, foi a mãe que perdi tão cedo. Agradeço ao meu pai e a minha irmã Ana, que sempre estavam manifestando seu carinho e apoio. Aos meus irmãos Carlos e Daniel e também as minhas tias Anita e Zulmira, e a minha prima Seila que sempre me apoiaram.

Aos meus colegas do laboratório, Cristiano Pauleto, Guilherme Dalpiaz, Sara Passos, Elaine Deuner, Aline Gerevine pelo apoio e amizade e agradeço especialmente a Marília Gabriela Hoffmann que além de ser meu “braço direito e esquerdo” nos experimentos com os meios de cultura, também foi e, é uma grande amiga nas horas de dificuldades, sempre impulsionando-me com palavras de otimismo;

À Dra Elene Yamazaki Lau pela orientação na parte molecular, pela sua disponibilidade incondicional em ajudar sempre e pela amizade e especialmente pelo apoio psicológico quando as reações não funcionavam.

Às pessoas dos diferentes setores da UPF que ajudaram no fornecimento de materiais, ao hospital veterinário, na pessoa do professor Luiz Carlos Kreutz que emprestou o termociclador para a

conclusão das análises moleculares, ao laboratório de biotecnologia na pessoa da professora Magali Grando.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na nessa etapa de minha vida. Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Transporte e transmissão da bactéria nas sementes.....	9
2.2 Controle de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> associadas às sementes de algodoeiro.....	11
2.3 Técnicas de detecção, quantificação e identificação.....	13
CAPITULO I - Detecção e identificação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvaceraum</i> a partir de sementes de algodão.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Origem e identificação das amostras de sementes.....	22
2.2 Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão.....	24
2.2.1 Diluição e plaqueamento em meio de cultura.....	24
2.2.2 Isolamento de <i>Xcm</i> pela distribuição das sementes diretamente nos meios de culturas.....	25
2.2.3 Teste em plântulas.....	25
2.2.4 Identificação das bactérias isoladas das sementes de algodão.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1 Diluição e plaqueamento em meio de cultura.....	26
3.3 Teste em plântulas.....	29
3.4 Identificação das bactérias isoladas das sementes de algodão.....	29
4 CONCLUSÕES.....	34

CAPITULO II - Identificação molecular das bactérias isoladas de sementes de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) oriundas de diferentes regiões produtoras.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Cultivo das bactérias e extração de DNA.....	39
2.2 Amplificação do gene 16S do RNAr.....	40
2.3 Purificação e quantificação dos produtos da PCR.....	42
2.4 Montagem das sequências contíguas e busca de similaridade.....	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1 Amplificação do gene 16S do RNAr.....	43
3.2 Purificação e quantificação dos produtos da PCR.....	44
4 CONCLUSÕES.....	50
CAPITULO III – Validação e aprimoramento de meios de cultura semi-seletivos para recuperação e quantificação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Determinação da concentração de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	57
2.2 Inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão.....	58
2.2.1 Inoculação por imersão.....	58
2.2.2 Inoculação por restrição hídrica.....	59
2.2.3 Inoculação a vácuo.....	59
2.3 Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes inoculadas artificialmente.....	60
2.4 Quantificação de inóculo de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes individuais.....	61
2.5 Procedimentos de assepsia e de centrifugação para a detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes inoculadas artificialmente.....	61
2.6 Avaliação da sensibilidade dos meios de cultura.....	62
2.8 Teste de germinação.....	62

2.9 Análise estatística.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1 Determinação da concentração de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	63
3.2 Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão inoculadas artificialmente por imersão.....	65
3.3 Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão inoculadas artificialmente por restrição hídrica.....	68
3.4 Quantificação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes inoculadas a vácuo.....	77
4 CONCLUSÕES.....	81
CAPITULO IV – Transmissão de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> de sementes para plantas de algodão ..	83
Resumo.....	83
Abstract.....	84
1 INTRODUÇÃO.....	86
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1 Inoculação das sementes.....	88
2.2 Quantificação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> de sementes inoculadas artificialmente.....	90
2.3 Teste em plântulas.....	90
2.4 Avaliação da transmissão da bactéria das sementes para as plantas.....	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4 CONCLUSÕES.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXOS.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Amostras de sementes de algodão analisadas para a detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	21
2	Reações fisiológicas e bioquímicas e de bactérias isoladas de sementes de algodão.....	31
3	Denominação das bactérias isoladas de sementes de algodão patogênicas ao algodoeiro.....	40
4	Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação e sequenciamento do 16S DNAr.....	41
5	Identidade das sequências de 16S DNAr de isolados de bactérias de sementes de algodoeiro com as sequências no GenBank do NCBI.....	45
6	Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> (<i>Xcm</i>) em sementes inoculadas artificialmente por imersão em diferentes meios de cultura.....	66
7	Efeito dos meios de cultura e das formas de extração de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes inoculadas artificialmente por restrição hídrica.....	69
8	Detecção e quantificação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão inoculadas a vácuo.....	78
9	Germinação de sementes de algodão em rolo de papel filtro.....	81
10	Transmissão de sementes <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> de sementes para plântulas de algodão.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão nos meios de cultura.....	27
2	Fungos contaminantes em sementes de algodão nos meios de cultura.....	28
3	Reação de plantas de algodão da cultivar DeltaOpal inoculadas com suspensões das bactérias isoladas das amostras de sementes.....	29
4	Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores no gene 16S DNAr de <i>Escherichia coli</i> .	41
5	Quantificação de DNAr do 16S após purificação.....	44
6	Número de UFC/mL de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em diferentes meios de cultura.....	64
7	Aspectos culturais de colônias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> extraídas de sementes de algodão inoculadas artificialmente e cultivadas nos meios 523 modificado; PSA+; NA+; MSS; MSXM e 523 (A). Características das colônias do padrão IBSBF 1880 em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) (B).....	67
8	Detecção de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes com diferentes níveis de incidências.	73
9	Colônias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> nos meios 523 modificado, MSXM e PSA+; A) T1; B) T2; C) T3 - sementes imersas em SFT - D) T5; E) T6; F) T7 - sementes imersas em água peptonada.....	74
10	Comportamento dos meios de cultura 523, NA modificado, e MSS a partir de diferentes números de sementes. A) T5, B) T1; C) T6.....	75
11	Lesões características de mancha angular em algodoeiro a partir de sementes inoculadas com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	98

DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E TRANSMISSÃO DE
***Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* EM SEMENTES DE**
ALGODÃO

RESUMO - Um dos fatores responsáveis por danos na produtividade do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é a ocorrência de doenças. A mancha angular, incitada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* é uma doença cujo controle é realizado basicamente, por meio de cultivares resistentes, e por sementes livres do patógeno. As sementes constituem uma relevante fonte de disseminação desse patógeno. No Brasil, nem sempre se faz uso de sementes certificadas, para a implantação de lavouras, favorecendo a ocorrência de epidemias. Este trabalho buscou promover melhoria da sanidade da cultura do algodoeiro mediante a avaliação de métodos e técnicas de detecção, identificação e quantificação de *X. citri* subsp. *malvacearum*, (*Xcm*) em sementes de algodão. Para tanto, foram avaliados, aprimorados e/ou validados métodos de natureza microbiológica. Sementes de algodão, naturalmente e artificialmente contaminadas foram avaliadas pelos métodos microbiológicos utilizando-se meios de cultura semi-seletivos descritos na literatura, bem como formas de extração para a detecção dessa bactéria foram avaliados. Sementes artificialmente contaminadas/infectadas foram plantadas para estudos de transmissão da bactéria das sementes para as plântulas. Esse estudo foi conduzido em laboratório e em casa de vegetação. Os resultados permitiram definir os meios de cultura 523 modificado e PSA+ como os que proporcionaram o desenvolvimento de *Xcm* com maior uniformidade, independentemente, das formas de

inoculação das sementes. Na avaliação das sementes comerciais oriundas de diferentes Estados da Federação, a presença de *Xcm* foi verificada em cinco, de um total de vinte e três amostras avaliadas, não sendo possível a quantificação do patógeno por meio de diluição e plaqueamento em meio de cultura. A partir das referidas amostras de sementes foram isoladas as bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, *Pantoea agglomerans* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, as quais causaram reações de hipersensibilidade em folhas de tabaco e patogenicidade em plantas de algodoeiro. A transmissão da bactéria da semente para planta a partir de sementes contaminadas artificialmente foi entre 0,016 a 0,15%. A resistência dos genótipos das plantas de algodão ou a agressividade da bactéria podem influenciar tais resultados. Isso também confirma a dificuldade em correlacionar os diferentes níveis de contaminação das sementes com o número de plantas que expressem a doença.

Palavras-chave: mancha angular, transmissão, *Gossypium hirsutum*

ABSTRACT - One of the factors responsible for yield losses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is the occurrence of diseases. The angular leaf spot incited by *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* is a disease whose control is accomplished primarily through resistant cultivars and pathogen free seeds. The seeds are one of the most important sources of spread of this pathogen. In Brazil, do not always make use of certified seeds for the establishment of crops, causing the occurrence of epidemics. This study aimed to promote improved health of cotton crops by evaluating methods and techniques for

detection, identification and quantification of *X. citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) in cotton seeds. The following factors were evaluated, improved and/or validated microbiological methods. Cotton seed naturally and artificially contaminated by microbiological methods were evaluated using culture media semi-selective in the literature, as well as ways of extraction for the detection of this bacterium were evaluated. Seeds spiked/infected planting were subjected to studies for transmission of the bacteria to plant seeds. This study was conducted in laboratory and greenhouse. The results allow to define the culture media and PSA + 523 modified as that provided the development of Xcm high uniformity regardless of types of seed inoculation. In assessing the commercial seed from different states of the country, the presence of Xcm was seen in five of a total of twenty-three samples tested was not possible to quantify the pathogen by dilution and plating in the culture medium. From these samples were isolated seed bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, *Pantoea agglomerans* and *Curtobacterium flaccumfaciens*, which caused hypersensitivity reactions in tobacco leaves and pathogenicity on cotton plants. The transfer of bacteria to plant seeds from artificially contaminated seeds was between 0.016 to 0.15%. The resistance of plant genotypes of cotton or the aggressiveness of the bacteria may influence these results. This also confirms the difficulty to correlate the different levels of contamination of the seeds with the number of plants that express the disease.

Key words: bacterial blight, transmission, bacterium, *Gossypium hirsutum*

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Smith 1901) Schaad et al. 2007 (= *Xanthomonas axonopodis* subsp. *malvacearum*) (*Xcm*) é uma doença controlada pelo uso de cultivares resistentes. Contudo, devido às condições favoráveis à ocorrência da doença, e a variabilidade do patógeno, nem mesmo estes atributos impedem a manifestação da doença, a qual é responsável por danos entre 10 a 20% principalmente em função da rápida propagação da bactéria e seu difícil controle (CHITARRA & ARAUJO, 2003).

A introdução da bactéria nas regiões produtoras de algodão ocorre via sementes de baixa qualidade fitossanitária, pois este é o meio mais eficiente de disseminação e sobrevivência do patógeno (CIA & SALGADO, 1995). Em adição, o curto intervalo entre as safras favorece a doença pelo aumento de inóculo (CASSETARI & MACHADO, 2000).

A bactéria responsável pela mancha angular, apresenta mais de 20 raças fisiológicas no mundo. No Brasil, conforme os estudos realizados há predominância da raça 18 e, conforme Cia & Salgado, (1997) foram isoladas as raças 3,7,8,10,13,18,19. Dentre as raças, algumas são altamente agressivas, tanto que são capazes de romper com a resistência da planta hospedeira (ALMEIDA, 2003; NUNES, 2003; DELANNOY, 2005; HUANG et al., 2008; ZHAI et al., 2010).

A semente é o principal veículo de disseminação para longas distâncias e de sobrevivência da bactéria, a qual pode manter-se viável por até quatro anos junto às sementes, mesmo após o

deslincamento ácido. Nesse sentido e associado à negligência quanto aos aspectos sanitários das sementes, o Ministério da Agricultura e Pecuária através da Portaria nº 3, de 5/1/2004 estabeleceu como “Padrão Sanitário”, nível de zero de tolerância para a bactéria *Xcm*, em sementes de algodoeiro.

Tendo em vista a ação destrutiva do patógeno e a falta de controle curativo, é evidente a necessidade de medidas preventivas visando o aprimoramento, avaliação e/ou desenvolvimento de procedimentos, métodos e técnicas padrão e/ou de referência para a detecção, identificação e quantificação de *Xcm*, em sementes de algodoeiro, de modo a subsidiar os padrões de qualidade, a serem adotados em análises de rotina, para a detecção e a identificação da bactéria *Xcm*, em sementes de algodoeiro. Nesse sentido, existem meios semi-seletivos destinados a detecção, sendo o meio PSA+ (METHA et. al., 2005) indicado para a detecção de *Xcm* de sementes (BRASIL, 2009). Alguns oligonucleotídeos iniciadores específicos para esta bactéria também foram desenvolvidos no intuito de detectar o patógeno nas sementes (BALANI, 2009; LELIS, 2009). Entretanto, ainda persiste a necessidade de estudos, tanto para eleger o método de extração quanto para definir o melhor método que possibilite a quantificação e o que melhor recupere e desenvolva colônias típicas de *Xcm*. Em adição a este fato, praticamente, inexistem dados relativos à taxa de transmissão do patógeno da semente para a plântula.

Sendo assim, os objetivos desse estudo foram avaliar, aprimorar e/ou desenvolver e validar procedimentos, métodos e técnicas padrão ou de referência, para detectar, quantificar e identificar *X. citri* subsp.

malvacearum em sementes de algodoeiro e verificar a transmissão dessa bactéria para a plântulas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das mais antigas espécies vegetais cultivadas no mundo e uma das mais importantes, por produzir a principal fibra têxtil utilizada pelo homem, além de vários outros produtos que são utilizados na alimentação humana e animal. Essa cultura, além da produção de fibra, também produz óleo (15,5%), línter (10%), torta (50%) e resíduos (4,9%), sendo que o óleo, o línter e a torta são extraídos das sementes (CIA & SALGADO, 2005; CIA & SALGADO, 1995).

No Brasil, a área plantada na safra 2011 foi de 1.401.004 hectares, com produção de 5.059.618 toneladas, e produtividade média de 3.611 kg/ha, sendo 72,6% superior a safra de 2010. Isso se deve, além de tecnologias, à expansão da área de plantio (IBGE, 2011).

As doenças causadas por vários fitopatógenos levam a queda na produção e instabilidade na qualidade das fibras. As principais doenças da cultura são a murcha de *Fusarium*, ramulose, mancha de alternaria, tombamento, mosaico das nervuras, mancha angular e as causadas por nematóides (CIA & SALGADO, 2005). A mancha angular é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Smith 1901) Schaad et al. 2007 (= *Xanthomonas axonopodis* subsp. *malvacearum*) (VAUTERIN et al., 1995) veiculada por sementes produzidas por plantas sintomáticas ou assintomáticas, descrita como problema, por não apresentar formas de controle curativo. A doença ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras de algodão do mundo. Sua importância econômica e severidade dependem de fatores ambientais e da resistência da cultivar. Os danos são da ordem de 5 a

35% (DELANNOY et al., 2005). No Brasil, os danos na qualidade da fibra são da ordem de 15 a 20%, mesmo com a utilização de variedades resistentes e principalmente quando as condições ambientais são favoráveis e sob alta pressão de inóculo (CIA & SALGADO, 1995). O problema agrava-se quando os produtores após extraírem a pluma, utilizam para comercialização as sementes que foram produzidas sem qualquer controle de qualidade. Essas sementes apresentam preço inferior e, além disso, podem veicular a bactéria, assim como outros fitopatógenos levando a queda na produtividade (ARAUJO et al., 2003).

Os sintomas dessa doença são manchas foliares de formato anguloso, delimitadas pelas nervuras, nas plântulas provenientes de sementes infectadas. As lesões podem ser observadas nos cotilédones com aspecto oleoso e coloração parda. As manchas, inicialmente, apresentam-se oleosas e de coloração verde e, posteriormente, adquirem aspecto necrótico, evoluindo para coloração marrom ou parda-escura. Comumente, ocorre coalescência das lesões evoluindo para dilacerações do limbo foliar. Nos caules e ramos, podem ser observadas lesões deprimidas, escuras e alongadas no sentido longitudinal. Nas maçãs, as lesões circulares são inicialmente encharcadas, formadas na parede do carpelo e, posteriormente, evoluem em podridão (CIA & SALGADO, 1995). No Estado de São Paulo uma nova sintomatologia em plantas de algodoeiro das cultivares Makina, IAC 24, e Deltaopal foi relatada por Malavolta et al., (2008). Os sintomas foram denominados como crestamento foliar que geralmente é acompanhado por halo clorótico, podendo causar sintomas em V invertido a partir dos bordos foliares.

A principal forma de controle é o uso de cultivares resistentes, no entanto, às vezes, nem mesmo esse atributo é suficiente uma vez que a bactéria apresenta diferentes raças fisiológicas e que não raramente superam os genes de resistência da planta. Estirpes altamente virulentas, capazes de infectar cultivares imunes foram descritas no ano de 1983 na África, contudo, os melhoristas encontram dificuldades para selecionar cultivares resistentes. Os sintomas da doença incitados por *X. c.* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) naquele continente são distintos dos sintomas previamente descritos da mancha angular. Existem especulações de que a diversidade deve-se a sua origem geoclimática ou ao elevado grau de agressividade da bactéria (YOUNG et al., 1996; AKELLO & HILLOCKS 2002; ARAÚJO, 2003; ARAÚJO & GOULART, 2004; ZHAI, et al., 2010).

2.1 Transporte e transmissão da bactéria nas sementes

A semente do algodoeiro é a principal fonte de inóculo constituindo-se no meio mais eficiente de disseminação para áreas consideradas livres desse patógeno (BRINKERHOFF & HUNTER, 1963; CIA & SALGADO, 1995).

A utilização de sementes sem certificação fitossanitária é um fator limitante da produtividade, especialmente nas condições de clima tropical do Brasil Central. A doença tem sido favorecida pelo curto intervalo de tempo entre a colheita do primeiro plantio e o segundo plantio da safra normal de algodão (CASSETARI et al., 2001; BRINKERHOFF & FINK, 1964). Adicionalmente, fatores como: cultivar, vigor da semente, viabilidade e localização da bactéria

na semente, práticas culturais, tipo de solo, pH da solução do solo, população de plantas, profundidade e época de semeadura, fertilização e microflora do solo e da semente associado aos fatores ambientais como umidade relativa de 85%, presença de ventos e temperaturas entre 30 e 36 °C e alta umidade do solo favorecem o desenvolvimento da doença. Além disso, o molhamento folhar, por neblina, nevoeiro, água da chuva ou de irrigação e orvalho são fatores importantes na disseminação do patógeno na lavoura (BIRD et al., 1981; CIA & SALGADO, 1995).

Geralmente, a transmissão de bactérias das sementes para a planta é normalmente muito baixa, menor do que 1% (SATTLER, 1989; SCHAAD, 2001; ROTH, 1989), de modo que, seriam necessárias 100 sementes para haver a possibilidade de se ter uma planta infectada. Mas considerando que em cada hectare sejam semeadas 100.000 sementes, isso representaria 1000 plantas que seriam focos da doença levando a grandes epidemias. Nesse sentido, associado aos vários fatores que favorecem a transmissibilidade, uma única planta infectada pode causar um surto epidemiológico (SCHAAD, 2001). Especificamente no caso do algodoeiro, os detalhes da transmissão de patógenos a partir das sementes têm sido pouco estudados e, com a escassez de informações acerca do momento exato em que os patógenos associados às sementes se manifestam, constituem-se riscos à cultura. Theodoro, et al., (2011) não observaram sintomas característicos da doença pela transmissão da referida bactéria da semente para a plântula a partir de sementes inoculadas por imersão. Os autores relacionaram isso com as

temperaturas médias entre 24,4 °C não favorável ao desenvolvimento da doença.

A bactéria *Xcm*, presente em sementes de algodoeiro pode sobreviver por até quatro anos (BRINKERHOFF & FINK, 1986; HUNTER & BRINKERHOFF, 1986; CIA & SALGADO, 1995), em geral, torna-se ativas logo após a semeadura das sementes em solos úmidos. Nessa fase, é possível ocorrer apodrecimento das sementes antes mesmo de germinarem. Ainda existe a possibilidade de afetarem as plântulas emergidas do solo. Em ambos os casos, a consequência direta é a obtenção de subpopulação de plantas (DHINGRA et al., 1980; SCHNATHORST, 1964). O risco de desenvolvimento de uma epidemia é dependente da taxa de transmissão da semente para a plântula e a taxa da doença na cultura é alta dependendo das condições ambientais.

2.2 Controle da *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* associadas às sementes de algodoeiro

Os mecanismos envolvidos na interação patógeno-semente, quanto ao transporte via sementes, a bactéria pode estar: associada externamente, sem infectar a semente; junto aos detritos vegetais e partículas de solo que estão com as sementes; ou associado internamente, infectando os tecidos da semente (DHINGRA et al., 1980). O maior desafio constitui no controle do patógeno veiculado internamente à semente, pois se encontra protegido contra grande parte das medidas de erradicação, por isso, o controle é dependente de sementes saudáveis e da resistência varietal (ZANDONÁ et al., 2005).

Alguns estudos com fungicidas cúpricos e estâmicos ou tratamento químico, físico e/ou biológico das sementes tem sido realizado por meio de pulverizações. O deslincamento com ácido sulfúrico acarreta na redução do inóculo, sendo indicado também uma medida de controle. Entretanto, não elimina o patógeno totalmente, quando este se encontra no interior da semente. Existe ainda, a possibilidade de aplicação foliar com princípio ativo de oxiclreto de cobre que apenas retarda o progresso da doença. Quando ocorrem longos períodos chuvosos o controle é ineficiente, e além de “lavar” o produto das folhas, favorece a disseminação do patógeno (ARAÚJO & SUASSUNA, 2003).

Complementarmente, a rotação de culturas é recomendada, sendo um meio eficiente para diminuição do patógeno no campo. Como o patógeno sobrevive de um ano para o outro em folhas infectadas, a eliminação de restos culturais do algodoeiro e a rotação com outras culturas são métodos erradicativos da *Xcm* (ARAÚJO & SUASSUNA, 2003). Essas duas medidas, entretanto, apesar de influenciarem a quantidade de inóculo inicial, diante de sementes contaminadas, apenas atrasam o início do desenvolvimento de epidemias (CIA & SALGADO, 1995).

Atualmente, a maioria das lavouras está sendo cultivada com cultivares resistentes, contudo, em condições favoráveis para a *Xcm* essas variedades podem não expressar resistência (FREIRE et al., 1999). Outra possibilidade de manejo da mancha angular é o controle biológico através da microbiolização de sementes com microrganismos antagonistas, ou mesmo pela aplicação na planta. Juntamente a essas práticas, tem-se investigado a possibilidade de uso

de indutores de resistência os quais têm apresentado resultados favoráveis. Os produtos mais utilizados são o acibenzolar-S-metílico (BAYSAL et al., 2003), produto silicato derivado de rocha magmática micronizada (PSiM) e quitosana. No entanto, recomendações em escala de campo ainda não estão disponíveis, merecendo, portanto, maiores investigações.

2.3 Técnicas de detecção, quantificação e identificação

É indiscutível que os testes de sanidade em sementes são ferramentas importantes para o controle de doenças bacterianas. Por isso, o fundamento da detecção de bactérias em sementes é identificar o patógeno de forma rápida e segura, de maneira a fornecer informações confiáveis e reproduzíveis quanto ao nível de contaminação da amostra, relacionando com as possibilidades de desenvolvimento do patógeno no campo (MACHADO, 1987; MACHADO & POZZA, 2005; MENTEN, 2005).

Dentre os vários métodos empregados para detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes estão: cultivo em meios de cultura semi-seletivos e seletivos, inoculação em plantas hospedeiras, uso de testes sorológicos, imunofluorescência, testes moleculares, entre outros (SATTler, 1971; HALFON-MEIRI & VOLCANI, 1977; MOHAN, 1983; KLEMENT, et al., 1983; VALARINI & MENTEN, 1992; KRUPPA et al., 1994; MARINGONI et al., 1994; SCHAAD, 2001; WALCOTT et al., 2001). Contudo, geralmente se utilizam combinações de métodos para a detecção e identificação. Por exemplo, normalmente faz-se uso de meios cultura semi-seletivos,

sejam sólidos, ou líquidos e após o isolamento da bactéria, procedem-se posteriores testes para a sua identificação. Estes testes variam desde a inoculação em plantas suscetíveis e reações de hipersensibilidade (HR) a testes fisiológicos, bioquímicos, e moleculares. A escolha do método depende de fatores como disponibilidade de reagentes e equipamentos e de pessoal treinado, de modo a fazer parte da rotina laboratorial. Busca-se baixo custo e praticidade de execução. É primordial que o método em uso satisfaça os critérios de especificidade, e sensibilidade, que seja aplicável para qualquer amostra, e que permita a detecção de células vivas do patógeno.

Segundo Zachowski & Rudolph (1988), nem sempre é possível detectar e identificar bactérias em sementes através do método de diluição seriada, seguida de plaqueamento em meio de cultura. Os autores sugerem que se utilizem meios enriquecidos para estimular o desenvolvimento das bactérias, presentes nas sementes, antes de se proceder ao isolamento. Entretanto, nem sempre se obtém sucesso com esse método, pois um dos fatores é a indisponibilidade de técnicas eficientes de extração das bactérias das sementes e de meios de cultura que possam ser seletivos ao patógeno alvo.

As técnicas de extração das bactérias das sementes para alguns patossistemas não são eficientes para quantificá-las podendo subestimar ou superestimar a concentração real do patógeno nas sementes. Aliado a esse fator, alguns meios de cultura não são seletivos suficientemente para proporcionar a recuperação e a visualização de colônias típicas, dificultando a caracterização através da morfologia das colônias (SHEPPARD et al., 1989; ROBERTS et al., 1997). As dificuldades na interpretação podem ser acarretadas,

muitas vezes, pela interferência de substâncias de inibição presentes no extrato da semente. Por isso, os meios semi-seletivos ou seletivos podem minimizar esses efeitos.

Para detecção de *Xcm* em sementes de algodoeiro, é recomendado colocar o extrato das sementes ou depositá-las sobre a superfície do meio de cultura (METHA et al., 2005). Esses autores relatam que a sensibilidade para a detecção utilizando o método da deposição de sementes sobre o meio seletivo foi de 0,02%. Porém, são necessários de no mínimo cinco mil sementes, tornando o método moroso e trabalhoso. Outros estudos recomendam para detecção e/ou quantificação de *Xcm* o uso de meio semi-seletivo, indicando que são precisos e confiáveis (METHA et al., 2005; BARBOSA, 2007).

A sensibilidade dos métodos que utilizam os extratos obtidos de sementes, em meios seletivos pode ser aumentada por meio do enriquecimento em meio de cultura e através da centrifugação, pois assim é possível concentrar o microorganismo alvo (MOURA et al., 2005; AGOSTINI, 2004). A expectativa em relação aos métodos de detecção e quantificação de bactérias nas sementes é que eles possam expressar o número de sementes infectadas ou infestadas de maneira que se obtenha a real condição de sanidade das mesmas para que sejam avaliados os riscos epidemiológicos (ROBERTS et al., 1993).

Dentre os métodos, para detecção e identificação, a sorologia é uma técnica que pode ser largamente utilizada em patologia de sementes, (VAN VUURDE, 1999). Dentre os métodos sorológicos utilizados, ELISA é o mais freqüente. As técnicas de sorologia têm várias outras variantes, entre essas a imunofluorescência como forma de suprimir os problemas de reação cruzada. Contudo,

ainda há escassez de antissoro no mercado nacional, pois, todo o material é importado e, nem sempre são compatíveis com as bactérias isoladas, não compensando os preços onerosos de importação.

As técnicas moleculares são desenvolvidas com intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção de bactérias. Contudo, os inibidores presentes no tecido vegetal podem prejudicar a ação da Taq polimerase. Além disso, é necessária a utilização de oligonucleotídeos altamente específicos para a bactéria alvo. Com a finalidade de intensificar a sensibilidade da técnica procura-se utilizar o enriquecimento da amostra, pela utilização de meios de cultura enriquecidos. Entretanto, o uso deste procedimento faz com que também aumente a concentração de bactérias saprófitas (RIBAS, 2007).

Os métodos moleculares, especialmente a PCR, são de alta sensibilidade e precisão e permitem caracterizar e apresentar resultados com mais rapidez no processo de identificação (LOUWS et al., 1994; AUDY, 1996).

Em vários trabalhos é proposto análise diretamente no extrato da semente, sem a necessidade do isolamento da bactéria e obtenção de colônias puras (MENG, et al., 2004). Essa técnica é usada com sucesso para a detecção de fitopatógenos em vários substratos. Porém, ainda requer aprimoramento para uso em larga escala na detecção de bactérias em sementes. Esse método não distingue células mortas de células vivas. Pode servir também como uma ferramenta que pode ser utilizada na triagem de materiais. As técnicas moleculares para a detecção de *Xcm* careciam de oligonucleotídeos iniciadores específicos para as raças fisiológicas presentes no Brasil.

Recentemente, Balani (2009) confeccionou um conjunto de oligonucleotídeos baseado no gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, cuja denominação foi Xam1F/2R. Estes amplificam fragmentos de DNA com cerca de 560 pb e mostraram-se altamente específicos na detecção de *Xcm* a partir de suspensões puras e mesmo a partir de extratos de sementes cuja detecção da bactéria não era possível em meio de cultura. A associação de Bio-PCR e nested-PCR favoreceu a detecção e identificação da bactéria nas sementes.

Outras técnicas podem ser utilizadas, como por exemplo, a citometria de fluxo, que associada com a microscopia é altamente precisa e rápida (CHITARRA et al., 2000). Há ainda, os kits bioquímicos, os quais também são excelentes ferramentas para utilização na identificação de patógenos. Contudo, muitas empresas e centros de diagnóstico vegetal ainda não possuem. Fator preponderante é que, muitos desses Kits, assim como os soros, são importados os quais elevam os custos da análise, além de muitas vezes necessitar de equipamentos específicos e de pessoal treinado.

CAPITULO I

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvaceraum* ASSOCIADAS A SEMENTES DE ALGODÃO

RESUMO - A mancha angular do algodoeiro é uma doença bacteriana cujas sementes são as fontes mais relevantes de disseminação. Cultivares resistentes e sementes livres do patógeno são as principais medidas de controle da doença. Contudo, mesmo com o uso de cultivares resistentes, a bactéria pode se estabelecer, uma vez que haja condições ambientais favoráveis. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi detectar, quantificar e identificar a bactéria nas sementes de algodão. Vinte e três amostras de sementes de algodão oriundas de diferentes Estados produtores foram avaliadas para a presença de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. As análises foram em seis meios de cultura para a detecção do patógeno. Foram utilizados os procedimentos de diluição seriada dos extratos obtidos das sementes a partir de soluções enriquecidas com água peptonada (1%) e não enriquecidas, seguido de centrifugação e posterior plaqueamento nos meios de cultura. Além disso, as sementes foram distribuídas diretamente sobre os meios de cultura e, plantadas em substrato e mantidas em casa de vegetação para a verificação da expressão dos sintomas da doença originada por *Xcm*. As bactérias isoladas das sementes foram inoculadas em plantas de algodoeiro e monitoradas quanto à expressão dos sintomas característicos da doença. Das 23 amostras de sementes, em apenas cinco foi verificada a presença da bactéria, sem a possibilidade de quantificação mediante

as técnicas utilizadas. Contudo, algumas bactérias atípicas, que induziram reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco e sintomas em plantas de algodão foram isoladas das demais amostras. Os resultados obtidos nesse experimento permitem definir que a maior parte das amostras de sementes avaliadas apresenta sanidade conforme a legislação vigente.

Palavras-chave: métodos, extração, bactéria, *Gossypium hirsutum*

ABSTRACT - The cotton blight is a bacterial disease whose seeds are the most important sources of spread. Resistant cultivars and pathogen free seeds are the main measures of disease control. However, even with the use of resistant varieties, the bacteria can be established, since there are favorable environmental conditions. In this sense, the objective of this study was to detect, quantify and identify the bacteria in cotton seeds. Twenty-three samples of cotton seeds from different producing states were tested for the presence of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. The tests were six culture media for the detection of the pathogen. We used the following serial dilution of the extracts of the seeds obtained from a solution enriched with water peptone (1%) and non-enriched, followed by centrifugation and subsequent plating on the culture media. Moreover, the seeds were distributed directly to the culture media, and planted in the substrate and kept in the greenhouse to check the expression of disease symptoms caused by Xcm. Bacteria isolated from the seeds were inoculated in cotton and monitored for expression of the characteristic symptoms of the disease. Of the 23 samples of seeds, in

only five was verified the presence of bacteria, without the possibility of quantification, using the techniques used. However, some atypical bacteria, which induced hypersensitive reaction in tobacco plants and symptoms in cotton plants were isolated from the other samples. The results of this study to define the most seed samples evaluated according to the present health legislation.

Key words: methods, extraction, bacterium, *Gossypium hirsutum*

1 INTRODUÇÃO

A maior parte das doenças do algodoeiro é causada por fungos, seguido por vírus, por nematóides e por bactérias. A bacteriose de ocorrência mundial é incitada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Smith) (SCHAAD et al., 2006) cuja doença denomina-se mancha angular, ou crestamento bacteriano. Este patógeno é capaz de infectar todas as partes da planta, ocasionando diferentes sintomas que variam de intensidade conforme as características ambientais, resistência do hospedeiro e variabilidade do patógeno.

As sementes são as principais fontes de inóculo da bactéria sendo por elas disseminadas para novas áreas de cultivo (CIA & SALGADO, 2005). De acordo Brinkerhoff & Hunter (1963), sementes com infecção entre 0,017 a 2,0% são responsáveis por severos danos em lavouras do Sudão e dos Estados Unidos.

No Brasil, existem relatos de que a taxa de transmissão interna das sementes é de 4% (CIA & SALGADO, 2005), entretanto existem poucas informações sobre a taxa de transmissão da bactéria em condições de campo.

Embora a utilização de cultivares resistentes à mancha angular seja uma alternativa eficiente de prevenção da doença, ainda existem produtores que não as utilizam. Dessa forma, com a adoção de sementes de baixa qualidade fitossanitária, a bactéria é veiculada, podendo permanecer nos restos culturais, servindo como inóculo em novas safras. Somado a isso, o surgimento de raças agressivas da bactéria, a doença torna-se problema (MORELLO et al., 2006).

Em face às alternativas de controle preventivo da doença a análise sanitária das sementes é fundamental e geralmente para a detecção e identificação de uma bactéria fitopatogênica faz-se necessário combinar várias técnicas. As formas mais comumente utilizadas para o isolamento de bactérias de sementes é através de meios de cultura seletivos ou semi-seletivos. Os testes de hipersensibilidade e patogenicidade em plantas hospedeiras testes bioquímicos, sorológicos e moleculares fazem parte do processo para a identificação das bactérias (SAETTLER, 1989; SCHAAD, 2001).

Visando detectar o agente causal da mancha angular, esse estudo também buscou quantificar e identificar a bactéria em sementes de algodão infectadas ou infestadas, oriundas de diferentes regiões produtoras de sementes de algodão no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de bacteriologia vegetal e em casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAMV da Universidade de Passo Fundo, no período de março de 2009 a março de 2012.

2.1 Origem e identificação das amostras de sementes

Sementes de algodão oriundas dos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e Paraná foram analisados para detectar a bactéria causadora da mancha angular. Vinte e três amostras de

sementes foram identificadas conforme a ordem de chegada no laboratório (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras de sementes de algodão analisadas para a detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

Cultivares	Procedência/Origem	Registro	Resistência Suscetibilidade
FMT 701	Fundação MT do Mato Grosso	T1	Resistente
FMT 523	Fundação MT do Mato Grosso	T2	Resistente
CNPA GO 809	EMBRAPA	T3	Moderadamente suscetível
CNPA MT 04 2080	EMBRAPA	T4	Suscetível
EPAMIG 110403	EPAMIG Minas Gerais	T5	Moderadamente suscetível
FM 910	Bayer	T6	Resistente
FM 910	Bayer	T7	Resistente
LDCV 22	Instituto Mato-grossense do Algodão-IMAMT	T8	-
LD 99012021	Instituto Mato-grossense do Algodão-IMAMT	T9	-
IMA 031318	Instituto Mato-grossense do Algodão-IMAMT	T10	-
IPR 140	Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR	T11	-
IPR JATAÍ	Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR	T12	-
CNPA BA 032059	EMBRAPA	T13	Resistente
DP 604BG	D & PL BRASIL LTDA	T14	Resistente
IAC 06-205	Instituto Agronômico IAC	T15	
FM 966	Bayer	T16	Resistente
IAC 25 RMD	Instituto Agronômico IAC	T17	Resistente
NUOPAL	D & PL BRASIL LTDA	T18	Resistente
BRS ACACIA	EMBRAPA	T19	Suscetível
FMT 709	Fundação MT do Mato Grosso	T20	Resistente
CNPA Ita 90	EMBRAPA	T21	Suscetível
BRS Ipe	EMBRAPA	T22	Moderadamente resistente
BRS Aroeira	EMBRAPA	T23	Moderadamente resistente

(-) informação não obtida

2.2 Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão

2.2.1 Diluição e plaqueamento em meio de cultura

Para a detecção de *Xcm* cada amostra foi subdividida em três sub-amostras constituídas de 100, 250 e 350 sementes, as quais foram imersas em 100, 125 e 175 mL de solução fisiológica + Tween 20 0,01% (SFT), respectivamente. Estas amostras colocadas em erlenmeers permaneceram durante 16 horas sob agitação de 140 rpm em temperatura de 4 °C. Após este período, o líquido foi centrifugado a 3864 xg durante 20 min. O sobrenadante foi descartado sendo que os sedimentos foram concentrados em aproximadamente 2 a 3 mL da mesma suspensão. Dessa suspensão foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} sendo 100 µL de cada diluição distribuída em triplicata nos seguintes meios de cultura: 523 de Kado & Heskett (1970); nutriente ágar modificado, Almeida et al. (2003); Meio PSA+ de Metha et al. (2005); MSXM de Soares (2006); MSS de Dezordi, (2006); e meio 523 modificado, por Barbosa (2007). As placas foram incubadas a 28 °C por até cinco dias, sendo observadas diariamente para a verificação do desenvolvimento das colônias de *Xanthomonas*.

O mesmo procedimento descrito acima foi efetuado utilizando solução peptonada 1% para estimular o desenvolvimento de *Xcm*. Além das diluições seriadas e plaqueamento em meio de cultura da mesma maneira como descrito anteriormente, o extrato obtido após a centrifugação foi inoculado no meio de cultura 523 modificado, por meio da técnica de esgotamento. O extrato obtido das sementes foi inoculado em folhas de plantas suscetíveis de algodoeiro, com auxílio de tesoura. Após a manifestação dos sintomas, as bactérias foram

reisoladas das folhas, purificadas em meio de cultura 523 e preservadas em goma xantana acrescida de PVP (TUMELERO & DENARDIN, 2008).

2.2.2 Isolamento de pela distribuição das sementes diretamente nos meios de cultura

Outro procedimento utilizado para o isolamento de *Xcm* das referidas amostras de sementes, foi a distribuição das sementes em placas de Petri contendo os meios de cultura citados anteriormente. Para tanto, foram utilizadas 100 sementes, após prévia assepsia, sendo distribuídas em número de 20 por placa. A incubação foi a 28 °C durante cinco dias, sendo observadas diariamente para a presença da bactéria.

2.2.3 Teste em plântula

As sementes foram semeadas em número de 100 por lote. Utilizaram-se bandejas contendo substrato comercial (Technomax ®). As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 25 a 30 °C. As primeiras avaliações foram logo após a germinação pela observação de lesões características da bacteriose. A observação dos sintomas foi durante 30 dias. As folhas com lesões suspeitas de mancha angular foram levadas ao laboratório para isolamento e identificação da bactéria.

2.2.4 Identificação das bactérias isoladas das sementes de algodão

Para a verificação das reações de hipersensibilidade em tabaco e dos postulados de Koch, as bactérias isoladas das amostras de sementes foram inoculadas em plantas de algodão consideradas suscetível a *Xcm*. Para isso, foram preparadas suspensões contendo concentração de 10^8 UFC/mL de cada isolado com 24 a 48 horas de incubação, e inoculadas em cotilédones e em folhas das plantas, com o auxílio de seringa esterilizada. Paralelamente, as bactérias padrão de *Xcm* IBSBF 555, IBSBF 1880, IBSBF 1779 e IBSBF 1733 foram inoculadas seguindo-se os mesmos procedimentos mencionados para as bactérias isoladas das sementes. As plantas foram avaliadas para a manifestação de hipersensibilidade e de sintomas. As folhas com lesões foram coletadas e registradas por fotografia e em seguida, procedeu-se o isolamento e posteriores testes para verificação de características culturais, tintoriais e bioquímicas. Os testes foram coloração de Gram, e de KOH a 3%, aspecto das colônias em meio de cultura 523, catalase, oxidase e hidrólise do amido.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diluição e plaqueamento em meio de cultura

A presença de *X. citri* subsp. *malvacearum* foi verificada nas amostras T3, T10, T16, T17 e T19, sendo que na amostra T19 isolaram-se quatro diferentes isolados, (A1, A2, A3 e A4) cujo gênero

foi confirmado por testes bioquímicos conforme Schaad, (2001) e patogenicidade em plântulas de algodão. Entretanto, foi impossível a quantificação, pois houve crescimento esporádico de algumas colônias com a técnica de diluição e plaqueamento nos diferentes meios de cultura (Figura 1). Mesmo nas repetições as colônias obtidas não possibilitaram a determinação do número de UFC/mL/g de *Xcm* nos referidos meios utilizados no experimento, sugerindo baixa contaminação das sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (2003) que somente detectaram e não conseguiram quantificar *Xcm* em meio de cultura. Contudo, os autores reforçam que o método pode ser utilizado na rotina laboratorial, por apresentar reprodutibilidade e baixo custo.

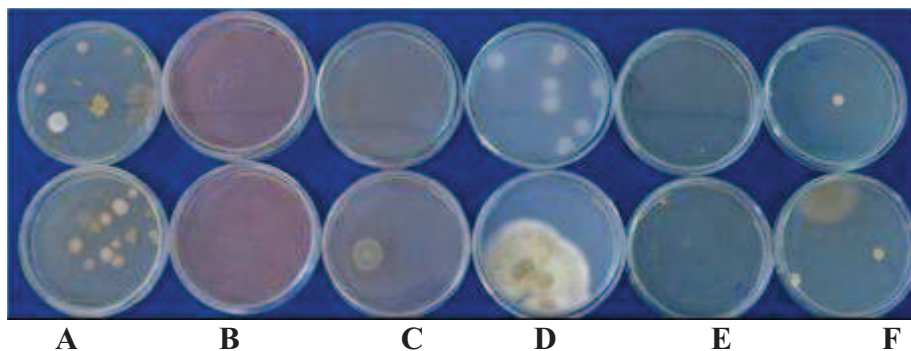


Figura 1. Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão nos meios de cultura: A) meio 523; B) meio PSA+; C) 523 modificado; D) MSS; E) MSXM e F) meio NA+

distribuídas diretamente nos meios de cultura, apresentou intenso crescimento de fungos contaminantes e nem mesmo a assepsia prévia das sementes e a presença de fungicidas na constituição dos meios,

reduziu a incidência dos fungos. Na Figura 2 é possível verificar a incidência de fungos nas sementes de algodão nos meios de cultura. Os resultados aqui obtidos não foram semelhantes aos de Barbosa (2007), pois a autora relata que obteve redução de contaminantes mediante a desinfestação das sementes colocadas diretamente no meio de cultura 523 modificado. Contudo, foi possível isolar *Xcm* de três sementes oriunda da amostra T19 e de duas sementes da amostra T10 (Tabela 1). Considerando que 100 sementes foram distribuídas nos referidos meios, isso representa incidência de 3 e 2%, respectivamente. A incidência da bactéria presente nestas amostras indica que elas não estão de acordo com a Portaria nº 3, de 5 de Janeiro de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

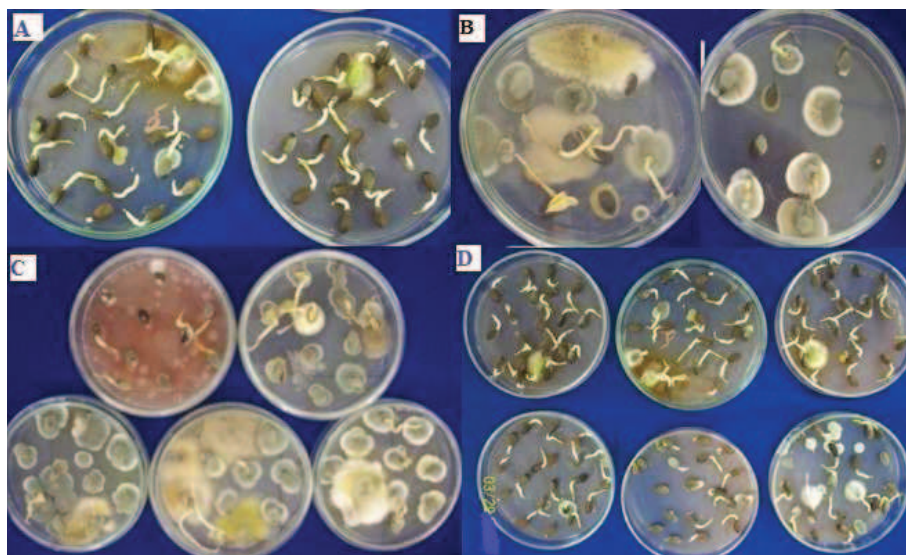


Figura 2. Fungos contaminantes em sementes de algodão nos meios de cultura. A e B) meio 523 modificado; C) meio PSA+ ; 523 modificado, MSS, MSXM e NA+; D) meio 523 modificado. Sementes de algodão, cultivar BRS Acacia.

3.2 Teste em plântulas

As plântulas oriundas de sementes de cada amostra, que foram semeadas e mantidas em casa de vegetação, não apresentaram sintomas da doença, mesmo assim, algumas dessas folhas com lesões suspeitas foram coletadas, porém não foi confirmada a presença da bactéria pelo isolamento a partir do tecido vegetal lesionado.

3.3 Identificação das bactérias isoladas das sementes de algodão

A partir dos extratos obtidos das sementes das amostras T4, T7, T6, T9, T11, T16, T17 e T19 foram isoladas bactérias atípicas que não foram quantificadas. Essas bactérias apresentaram reações positivas nos testes de hipersensibilidade em plantas de tabaco e/ou patogenicidade em plantas de algodoeiro. As bactérias padrão IBSBF 1880, 555 e 1733 apresentaram sintomas de mancha angular nas folhas de algodão inoculadas artificialmente (Figura 3).

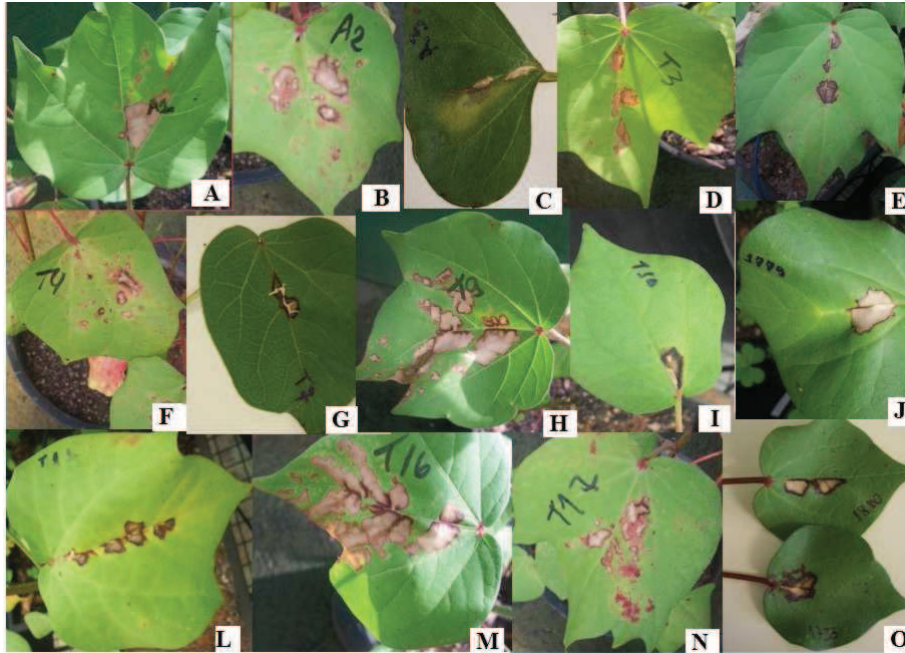


Figura 3. Reação de plantas de algodão inoculadas com suspensões das bactérias isoladas das amostras de sementes. A, B e C - sintomas dos isolados da amostra T19; D - isolado da amostra T3; E - bactéria padrão IBSBF 555; F - isolado da amostra T4; G - isolado da amostra T7; H - isolado da amostra T9; I - isolado da amostra T10; J - bactéria padrão IBSBF 1779; L - isolado da amostra T11; M - isolado da amostra T16; N - isolado da amostra T17; O - bactérias-padrão IBSBF 1880 e 1733.

As reações fisiológicas e bioquímicas apresentadas pelas bactérias isoladas das sementes estão registradas na Tabela 2. Os isolados A3, T3, T10, T16 e T17 que apresentaram reação de Gram negativas, oxidase negativa, catalase positiva, hidrólise de amido, patogenicidade em algodoeiro. Além disso, o aspecto mucoso e convexo das colônias, coloração amarela e com bordos lisos são características do gênero *Xanthomonas*.

Tabela 2. Reações fisiológicas e bioquímicas de bactérias isoladas de sementes de algodoeiro

Bactérias isoladas/ Cultivares/ Resistência à mancha angular	Testes					
	Gram	Cresc. 40 °C	Oxidase	Catalase	Hidrólise de amido	Pigmento amarelo em meio 523
T3/CNPA GO 809/MS	-	-	-	+	+	+
T4/CNPA MT 042080/S	-	+	-	+	-	+
T6/FM 910/R	-	-	-	+	-	+
T7/FM 910/R	-	-	-	+	-	+
T9/LM 99012021/SI	+	-	-	+	-	+
T10/IMA 031318/SI	-	-	-	+	+	+
T11/IPR 140/SI	+	+	-	+	-	+
T16/FM966/R	-	-	-	+	+	+
T17/IAC 25RMD/R	-	+	-	+	+	+
T19 (A1)/BRS ACACIA/S	-	+	-	+	-	+
T19 (A2)/ BRS ACACIA/S	-	-	-	+	-	+
T19 (A3)/ BRS ACACIA/S	-	-	-	+	+	+
T19 (A4)/ BRS ACACIA/S	-	+	-	+	-	+
T21 (L3)/ CNPA ITA90/S	+	+	-	+	-	+
PADRÃO/IBSBF1880	-	-	-	+	+	+
Reações conforme Schaad et al., 2001						
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	+	nd	-	nd	-	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	V	-	nd	-	+
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	-	-	-	+	+	+

(MS) moderadamente suscetível; (S) suscetível; (R) resistente; (SI) sem informação (+) reação positiva; (-) reação negativa; (nd) não determinado; (V) reação variável

Conforme os resultados obtidos, é possível afirmar que das 23 amostras avaliadas para a presença de *Xcm*, foi detectada em cinco amostras das cultivares CNPA GO 809, IMA 031318, FM 966, IAC 25 RMD e BRS ACACIA.

Alguns autores relatam que nem sempre é possível detectar as bactérias de sementes por meio de diluição seriada e

plaqueamento em meio de cultura. Entretanto, em casos de baixa incidência do patógeno, é indicado um enriquecimento prévio o qual normalmente se dá pelo uso de meio de cultura líquido, ou mesmo água peptonada, nos quais as sementes são imersas e mantidas por certo período, normalmente sob baixas temperaturas (ZACHOWSKI & RUDOLPH 1988; MOURA et al., 2005; AGOSTINI, 2004). O procedimento de enriquecimento em água peptonada foi utilizado nas amostras de sementes, e mesmo assim, o desenvolvimento de *Xcm* foi baixo ou inexistente na maior parte das amostras avaliadas.

A baixa infecção das sementes analisadas revela possivelmente, a eficiência das práticas de manejo da cultura. Atualmente a grande parte dos genótipos de algodoeiro utilizados apresenta resistência à *Xcm*. É provável também que, associada às condições climáticas durante o período de cultivo da planta, a incidência da doença tenha sido baixa ou mesmo nula e que consequentemente resultou em sementes com qualidade sanitária satisfatória.

O ambiente e/ou potencial de inóculo são condições extremamente favoráveis ao desenvolvimento da doença. Barros et al. (2008) avaliaram a incidência da bactéria e outras doenças em diferentes cultivares de algodão nas safras 2000/2001 e 2001/2002 e verificaram resultados variáveis entre as safras, sendo a maior incidência da doença na primeira safra, principalmente para as cultivares consideradas suscetíveis à mancha angular. Os autores ressaltam que durante a safra de 2000/2001 houve mais períodos chuvosos. Da mesma forma, nas safras de 2007/08 e 2008/09 a avaliação de doenças no algodoeiro nos Estados do Mato Grosso e

Goiás revelaram ausência de plantas com sintomas de mancha angular na safra 2007/2008. Os autores relacionam tal fato à utilização de sementes livres do patógeno ou de cultivares resistentes, ou ainda em função do ambiente desfavorável ao desenvolvimento da doença (SILVA et al., 2009). Nesse sentido, é provável que a ausência e a baixa incidência verificada nas amostras de sementes avaliadas no presente trabalho esteja associada aos fatores desfavoráveis ao desenvolvimento da doença na lavoura, pois quanto maior a incidência da doença nas plantas, maior a probabilidade da bactéria atingir as sementes. Sabe-se que, a partir de lesões presentes na planta, a bactéria é disseminada juntamente com respingos de chuva e vento, para novas plantas e, assim também, pode infectar as sementes, principalmente no momento que os capulhos estão maduros.

Vale ressaltar que cultivares resistentes e sementes livres do patógeno são medidas preventivas de controle dessa doença. Entretanto, sabe-se que a doença pode se desenvolver mesmo com a utilização de tais componentes.

A variabilidade genética do patógeno associada às características ambientais pode mascarar os mecanismos de defesa da planta. Exemplo disso foi verificado por Malavolta et al. (2008) que isolaram *Xcm* apresentando uma nova sintomatologia que se expressa em plantas de algodoeiro, independentemente da resistência do hospedeiro. Essa bactéria, além dos sintomas comuns da mancha angular, promove um crestamento foliar que geralmente é acompanhado por halo clorótico, sendo a região afetada normalmente quebradiça e parda, cuja evolução é a abscisão das folhas severamente

atacadas. Em função desses atributos, a doença está entre as mais importantes da cultura do algodoeiro.

4 CONCLUSÕES

Os métodos empregados para detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* permite concluir baixa incidência desta bactéria nas amostras de sementes. Contudo, é possível verificar que mesmo apresentando baixa incidência, determinadas amostras apresentaram-se com essa bactéria a níveis que levam a indícios de lotes que possivelmente estariam fora dos padrões sanitários.

CAPITULO II

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SEMENTES DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L.) ORIUNDAS DE DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS

RESUMO - A identificação de bactérias nem sempre é um processo fácil. Atualmente a biologia molecular dá suporte por meio de várias técnicas e entre elas o seqüenciamento parcial ou integral de genes e ou genoma. O objetivo desse trabalho foi identificar as bactérias isoladas de sementes de algodão por meio da amplificação e seqüenciamento do gene 16S do DNAr. Para isso, onze bactérias isoladas das sementes foram cultivadas em meio de cultura por 48 h para a posterior extração do DNA. A amplificação parcial do 16S DNAr foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e 16S760r. Após a eletroforese e purificação das amostras foram quantificadas em gel de agarose com auxílio do marcador de DNA fago lambda. Dessa forma, prepararam-se amostras contendo 50-60 ng de DNA as quais foram enviadas para sequenciamento. Formaram-se as sequências contíguas e buscou-se a similaridade das mesmas com sequências disponíveis no GenBank do NCBI mediante a plataforma Blast. As sequências apresentaram percentagem de identidade entre 99 e 100% com DNAr 16S das bactérias *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* sp., *Xantomonas citri* subsp. *malvacearum* e *X. axonopodis* pv. *punicae*.

Palavras-chave: sequenciamento, gene16S DNAr,

ABSTRACT - The identification of bacteria is not always an easy procedure. Currently, molecular biology supports through various techniques and including the partial or complete sequencing of genes, or genome. The aim of this study was to identify bacteria isolated from cotton seeds by amplification and sequencing of 16S rDNA. For this, eleven bacteria isolated from the seeds were grown in culture for 48 h subsequent to extraction of DNA. The partial amplification of 16S rDNA was performed using primers Y1 and 16S760r. After electrophoresis and purification of the samples were quantified in agarose gel with the aid of lambda phage DNA marker. Thus, samples were prepared containing 50-60 ng of DNA which have been sent to sequencing. Obtained DNA sequences were formed contiguous sequences and sought the similarity of these sequences in GenBank with the NCBI Blast through the platform. The sequences presented percent identity between 99 and 100% with 16S rDNA of the bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium* sp. *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* sp. *Xanthomonas citri* subsp. and *X. malvacearum axonopodis* pv. *punicae*

Key words: sequencing, gene16S rDNA, phytopathogenic bacteria

1 INTRODUÇÃO

A maioria das bactérias fitopatogênicas é veiculada pelas sementes para novas áreas de plantio. No algodoeiro, a bacteriose mais comum em todas as regiões de cultivo é causadora da mancha angular, *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* (*Xcm*) (Smith 1901) Schaad et al. 2007 e conforme a legislação brasileira, não é indicado o plantio de sementes contaminadas com essa bactéria, já que elas são as principais fonte de sobrevivência e disseminação. Uma das medidas para evitar a introdução do patógeno para novas áreas é a utilização de técnicas que avaliem a sanidade das sementes e conforme já relatava Neergaard (1979) a análise de rotina é extremamente importante para assegurar a certificação de sementes. Por isso a sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e precisão, além de custos, são essenciais para os procedimentos de detecção em rotina laboratorial (DENARDIN, 2004; DEZORDI, 2005).

Tradicionalmente, as bactérias são caracterizadas através de técnicas de cultivo puro, utilizando-se critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Esses métodos de cultivo são imprescindíveis na rotina laboratorial, porém em muitos casos limitam a detecção e a identificação. A biologia molecular tem auxiliado na identificação e caracterização de vários fitopatógenos, e atualmente seu uso é indispensável para a organização taxonômica e filogenética dos microrganismos (LOUWS et al., 1999). Dentre os métodos moleculares para detectar bactérias fitopatogênicas, destaca-se a PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase) a qual se baseia na amplificação de uma determinada sequência alvo de DNA

do microrganismo. O método reflete sensibilidade, especificidade e rapidez, satisfazendo assim os principais requisitos para detecção, identificação e diferenciação de espécies e subespécies de patógenos de plantas. Esse método ainda permite detectar o agente causal da doença diretamente do tecido vegetal (LOUWS et al., 1999).

Há cerca de três décadas deram-se início os estudos filogenéticos com o gene 16S do rRNA (ácido ribonucléico ribossomal), e atualmente, com a disponibilidade de sequenciadores automáticos, o sequenciamento desse gene e de vários outros tornou-se uma prática comum, rápida e específica para os mais variados estudos e entre estes, a identificação de bactérias. Sabe-se que os rRNAs são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos. O ribossomo bacteriano é composto do RNA ribossomal e várias proteínas (WOODSON & LEONTIS, 1998). Esses genes têm distribuição universal e, estão nos diferentes grupos de seres vivos, sendo uma molécula com alto grau de conservação. O 16S rRNA possui aproximadamente 1500 nucleotídeos, apresentando grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (AMANN 1995; LUDWING, 2000). A caracterização deste gene tem sido estabelecida como método padrão para identificar espécies, gêneros e famílias de bactérias, em função de ser uma região altamente conservada em bactérias e outros organismos (GURTLER & STANISISH, 1996). A vantagem de se utilizar essa técnica é a disponibilidade de um grande número de sequências do 16S rRNA que estão depositadas em bancos de dados como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) cujo acesso é gratuito, permitindo a

comparação de novas sequências obtidas com as sequências presentes nessas bases (COUTINHO et al., 1999).

Esse trabalho buscou identificar estes isolados por meio da amplificação e do seqüenciamento do gene 16S do RNA ribossomal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de bacteriologia vegetal e em casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAMV da Universidade de Passo Fundo, no período de março de 2009 a março de 2012.

2.1 Cultivo das bactérias e extração do DNA

As bactérias isoladas das amostras de oito cultivares semente de algodão (BRS Acacia, CNPA MT 042080, FM 910, LD 99012021, IMA 031318, IPR 140, FM 966, e ITA 90) totalizando onze isolados que foram denominados de acordo com a Tabela 3.

Posteriormente aos testes de hipersensibilidade e patogenicidade em algodoeiro, as estirpes foram preservadas em goma xantana + PVP (TUMELERO & DENARDIN, 2008) e mantidas em temperatura de 4 a 8 °C.

Para a extração do DNA das bactérias, utilizaram-se culturas com 48 h de incubação em meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970) sob temperatura de 28 °C. Procedeu-se a extração de DNA conforme protocolo descrito por Cheng, et al., (2006).

Tabela 3. Denominação das bactérias isoladas de sementes de algodão patogênicas ao algodoeiro

Sementes das cultivares de algodão/Origem	Estirpes isoladas
BRS ACACIA / EMBRAPA	A1, A2, A4 (T19)*
CNPA MT 04 2080 / EMBRAPA	T4
FM 910 / Bayer	T6
FM 910 / Bayer	T7
LD 99012021 / IMAMT	T9
IMA 031318 / IMAMT	T10
IPR 140 / IAPAR	T11
FM 966 / Bayer	T16
Ita 90 / EMBRAPA	L3 (T21)*

IMAMT - Instituto Matogrossense do Algodão, IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná. *denominação dos isolados obtidos das amostras T19 e T21 (sementes de algodão da cultivar BRS ACACIA e ITA 90).

2.2 Amplificação do gene 16S do DNAr

Para a amplificação do gene DNAr das bactérias isoladas das sementes foram utilizados os oligonucleotídeos desenvolvidos a partir do 16S DNAr de *Escherichia coli* e estão listados na Tabela 4. As regiões de anelamento no gene estão esquematizados na Figura 4, cujos fragmentos esperados são de 1155 pb e 770 pb.

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação e sequenciamento do 16S DNAr

Denominação*	Sequência 5'-3'	% CG	Tm (°C)
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	67	67,9
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	60	63,0
Y3	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	50	59,9
16S760r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	67	64,1

*A denominação dos oligonucleotídeos iniciadores é conforme a posição em que se encontra a última base nitrogenada na posição 3' na sequência do 16S do DNA ribossomal de *Escherichia coli*; (f) e (r) – iniciador direto ou reverso, respectivamente. (YOUNG et al., 1991; CRUZ, 2001)

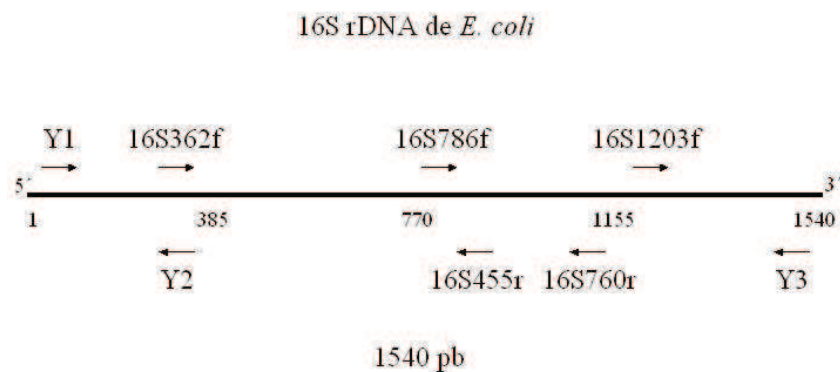


Figura 4. Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores no gene 16S DNAr de *Escherichia coli*. Fonte: PISA, 2006

A reação foi composta por volume 60 μ L sendo constituída por tampão da enzima 1x, 0,75 mM de dNTPs, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,25 U de Taq polimerase e aproximadamente 100 ng de DNA de cada isolado. A

amplificação foi em termociclador (Minicycler™ MJ Research). A temperatura inicial de desnaturação da fita DNA foi de 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 45 s; 62 °C por 45 s; 72 °C por 1 min e no último ciclo essa temperatura foi mantida durante 7 min.

2.3 Purificação e quantificação dos produtos da PCR

Amostras de 5 µL, de cada reação foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1X, coradas em brometo de etídio e visualizadas em transluminador. Após a confirmação da amplificação, procedeu-se a purificação das amostras para o encaminhamento ao sequenciamento. Dessa forma, nova eletroforese foi realizada contendo um volume de 50 µL de cada reação. Os fragmentos contendo a sequência alvo foram recortados do gel e purificados conforme protocolo do fabricante do kit de purificação (HiYield™ Gel/PCR DNA minikit - Real Genomics™). Após a purificação o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% com auxílio do marcador padrão de DNA fago lambda com concentrações conhecidas de 50, 100 e 200 ng.

Os fragmentos amplificados e purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório Ludwig-Biotec, Porto Alegre, RS. As amostras foram constituídas de um volume final de 6 µL, contendo entre 50 e 60 ng de DNA molde e 4,5 pmol de cada oligonucleotídeo.

2.4 Montagem das sequências contíguas e busca de similaridade

As sequências contíguas foram montadas a partir das sequências parciais da subunidade 16S do DNAr obtidas com os oligonucleotídeos Y1 e 16S760 para a fita direita e reversa, respectivamente. A qualidade do sequenciamento foi verificada através do programa “Phred-Phrap-Consed”. As bases nitrogenadas com valores acima de 25 foram consideradas de boa qualidade. As sequências foram comparadas às depositadas no GenBank através do MegaBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), na data de 25/03/2012. Foi utilizado também o software Bibi (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>), utilizando o banco de dados BacteriaArcheae_SSU-rDNA-16S_stringent, específico para identificação de bactérias, cujo banco de dados foi compilado em 18/03/2012.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação do gene 16S do DNAr

Os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y3 permitem amplificar todo o gene 16S, que equivale a 1500 pb aproximadamente. Contudo, para os isolados testados neste trabalho, não foi obtida amplificação do fragmento correspondente. Já utilizando os pares de oligonucleotídeos 16S786r e Y3; Y1 e 16S760r a amplificação foi possível. Entre essas ampliações, optou-se pelo sequenciamento do

maior fragmento do gene, que foi obtido pelo segundo par de oligonucleotídeos iniciadores citado acima.

3.2 Purificação e quantificação dos produtos da PCR

Na Figura 5 verifica-se o produto da amplificação do DNA, após a purificação do fragmento de interesse, das bactérias isoladas das sementes de algodão. As amostras foram comparadas e quantificadas com relação ao marcador de DNA do fago lambda. A quantidade de DNA extraída das bactérias A1, T6 e T7 não foi suficiente para o sequenciamento.

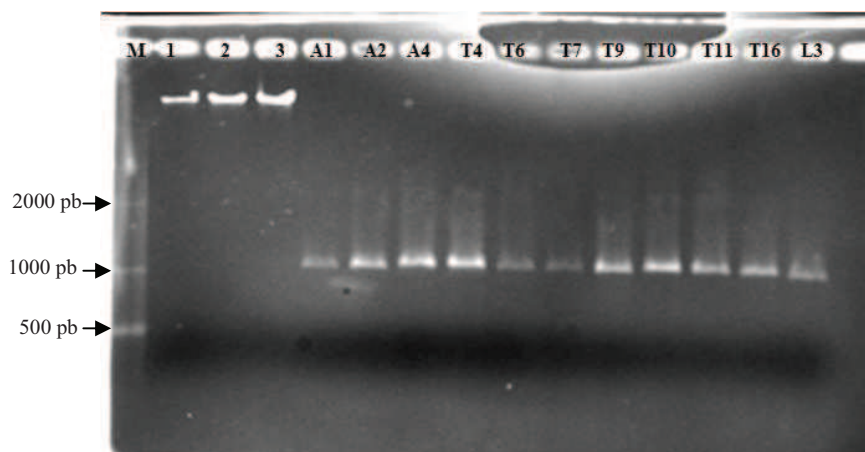


Figura 5. Quantificação de DNAr do 16S após purificação. M) Marcador 1 Kb DNA (RBC); 1, 2, 3- Fago Lambda 50 ng, 100 ng e 200 ng (Invitrogen); A1, A2, A4, T4, T6, T7, T10, T11, T16, L3 – Produto de PCR purificado de DNA de bactérias extraídas de amostras das sementes

Sequências de sete isolados (Tabela 5), foram obtidas com os tamanhos variando de 594 a 1005 nucleotídeos. Considerando os

três alinhamentos mais significativos, há sequências no banco de dados com 99 e 100% de identidade com as obtidas neste trabalho, sendo pertencentes aos gêneros *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Erwinia* e *Xanthomonas*.

A análise utilizando o software Bibi sugeriu a identificação ao nível de espécie dos isolados A4 e T9 como *Pantoea agglomerans* e *Curtobacterium flaccumfaciens* (Tabela 5). Para as demais sequências somente não foram sugeridas espécies por possuírem mais de uma no agrupamento com o mesmo nível de identidade. No entanto, foi possível inferir ao nível de gênero.

Tabela 5. Identidade das sequências de 16S DNAr de isolados de bactérias de sementes de algodoeiro com as sequências no GenBank do NCBI

Isolado	Fragmento da sequência (pb)	Alinhamentos mais significativos (código da sequência no NCBI)	Valor e	Extensão do alinhamento (% identidade)
A4	992	<i>Pantoea agglomerans</i> (HQ647279)	0	992/992 (100)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (HQ647265)	0	992/992 (100)
		<i>Erwinia</i> sp. (HQ706112)	0	992/992 (100)
T4	594	<i>Pantoea anthophila</i> (JN644500)	0	594/594 (100)
		Uncultured bacterium (HM219655)	0	594/594 (100)
		<i>Pantoea ananatis</i> (AJ13355)	0	594/594 (100)
T9	975	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (JF496347)	0	972/975 (99)
		<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (JF700461)	0	972/975 (99)
		<i>Curtobacterium</i> sp. (GU595359)	0	972/975 (99)
T10	1005	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i> (JQ067629)	0	1005/1005 (100)
		<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> (FR749944)	0	1005/1005 (100)
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (JQ513818)	0	1004/1005 (99)
T11	993	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i> (JQ067629)	0	993/993 (100)
		<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> (FR749944)	0	993/993 (100)
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (JQ513818)	0	992/993 (99)
T16	1005	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i> (JQ067629)	0	1005/1005 (100)
		<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> (FR749944)	0	1005/1005 (100)
		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (JQ513818)	0	1004/1005 (99)
L3	970	<i>Curtobacterium citreum</i> (GU188922)	0	970/970 (100)
		<i>Curtobacterium</i> sp. (HQ219883)	0	969/970 (99)
		<i>Curtobacterium</i> sp. (HM459850)	0	969/970 (99)

Sabe-se que os genes do RNAr são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos. A caracterização do gene 16S do RNAr tem sido estabelecida como método padrão para a identificação de espécies, gêneros e famílias de bactérias, em função de ser uma região altamente conservada em bactérias e outros organismos (GURTLER & STANISISH, 1996).

O sequenciamento do gene 16S RNAr vem sendo utilizado na identificação de novas bactérias há cerca de três décadas. Entretanto, existem duas dificuldades principais na interpretação das sequências obtidas a partir desse gene. A identificação depende de uma significativa diferença inter-espécies e uma pequena diferença intra-espécies. O maior agravante é quando duas ou mais bactérias compartilham a mesma sequência. É sugerido que a diferença da sequência de maior identidade (>98% de identidade) em relação às outras sequências depositadas no banco de dados seja acima de 3% para definir uma espécie. Entre 2% a 3%, a identificação seria duvidosa (WOO et al., 2009). Outra dificuldade é quando não existe a sequência da bactéria já identificada nos bancos de dados, neste caso também impossibilitando a identificação. Ressalta-se que para a identificação de uma bactéria é importante verificar as características fenotípicas e bioquímicas, ou mesmo o sequenciamento de outros genes que possam auxiliar no processo de identificação. Ainda podem ser citados erros na identificação da sequência depositada, diferenças entre membros da família gênica dentro de um mesmo organismo. Contudo, conforme relata Young (2001), a subunidade menor (16S) do RNA ribossomal é estabelecida como marcador universal, que determina a posição taxonômica, sendo indispensável à descrição de

uma nova espécie. Para prevenir estes erros é importante que os resultados obtidos pelo sequenciamento sejam interpretados com base nos testes fenotípicos.

A presença de intensa flora bacteriana nas sementes as caracteriza como fontes de inóculo. Entre as bactérias isoladas das sementes de algodoeiro, identificou-se a presença de *Curtobacterium flacumfaciens*. Essa bactéria possui uma ampla gama de hospedeiros, desde espécies cultivadas e não cultivadas (SAETTLER, 1989). Nesse sentido, plantas de algodoeiro seriam hospedeiras de *C. flacumfaciens*, uma vez que está bactéria encontrava-se presente nas sementes.

A bactéria *C. flacumfaciens* pv. *flacumfaciens* (*Cff*) (HEDGES, 1922) Edlins e Jones (1983) causa a murcha bacteriana do feijoeiro, cujos sintomas mais característicos são murcha nas folhas causada pela degradação dos vasos do xilema, escurecimento vascular com posterior morte da parte aérea. Além de plantas de feijão, essa bactéria causa doença em diversas leguminosas sendo relatada no Brasil em 1997 (MARINGONI & ROSA, 1997). A presença dessa bactéria expressando sintomas de murcha em soja já foi verificada por Hedges (1926) e mais tarde por Schuster & Sayre (1967) citados por Pinto (2005). Até essa época era restrita a regiões temperadas (COELHO, et al., 2004).

De acordo com Pinto (2005), 97,4% dos genótipos de soja apresentaram susceptibilidade para *Cff* isolada de feijoeiro. Plantas jovens, com cerca de 10 dias, apresentaram maior suscetibilidade, ao passo que as plantas com 20 a 30 dias tornaram-se mais resistentes, porém não impediram a colonização da bactéria. As plantas que apresentaram severidade de sintomas da doença produziram sementes

contaminadas com *Cff*. Por meio desses resultados a autora infere a possibilidade dessa bactéria vir a se tornar problema para a cultura da soja, pois a bactéria poderia infectar naturalmente a soja, uma vez que se utilizam intervalos curtos entre o plantio das culturas de feijão e soja.

As sementes são portadoras de um vasto grupo de microrganismos e a transmissão dos patógenos para plantas que apresentam interações compatíveis é bem evidenciada, entretanto, a transmissão de patógenos de sementes para planta ou de planta para semente em interações incompatíveis não é bem estudada. A transmissão de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) de flores para sementes e de sementes para plântulas foi verificada a partir de interações incompatíveis com feijoeiro e comparado com a interação compatível entre *X. citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e feijoeiro. As flores que foram inoculadas com *Xcc* produziram sementes com alto nível de sementes contaminadas, bem como houve transmissão da bactéria das sementes para plântulas. Isso indica que as sementes ou as plantas não hospedeiras podem ser uma importante fonte de inóculo de patógenos bacterianos (DARRASSE, 2010). Tal fato pode ser comparado ao encontrado nesse estudo, pois *C. flaccumfaciens* sendo patógeno do feijoeiro apresentaria reação incompatível com o algodoeiro, porém, sua presença nas sementes indica que a cultura pode ser hospedeira. Pelos resultados observados o algodoeiro não só foi hospedeiro da bactéria, mas promoveu uma interação compatível com a bactéria, podendo ser uma causadora de doença na cultura.

Outra bactéria isolada das sementes de algodoeiro foi *Pantoea agglomerans* a qual apresentou patogenicidade em plantas de

algodoeiro. Há informações da presença dessa bactéria como agente causal da podridão dos capulhos. Porém, a etiologia da doença pode ser fúngica ou bacteriana podendo ser causada por mais de 170 espécies de microrganismos diferentes. A maioria destes é oportunista que se aproveitam dos ferimentos causados pelos insetos. Dentre os agentes causais primários está a bactéria *Pantoea agglomerans* que possui habilidade para penetrar nos tecidos da planta através das aberturas naturais e também por injúrias. A doença é amplamente dependente das condições de alta umidade e chuvas intensas. Danos de até 20 % foram relatados entre os anos de 1991 a 2000 nos Estados Unidos (KIRKPATRICK & ROTHROCK, 2001). A podridão dos capulhos do algodoeiro é responsável por danos significativos nos Estados da Carolina do Sul, nos Estados Unidos e em outros países. O agente causal dessa doença nem sempre é fácil de ser identificado, devido à ausência de sintomas visíveis principalmente em capulhos jovens. A doença caracteriza-se como descoloração do linter, com a necrose dos tecidos das fibras e das sementes, evoluindo para a morte das mesmas. Ocorre a maturação desuniforme das fibras e sementes. Até o ano de 2004 não havia um diagnóstico seguro quanto ao agente causal da doença (MAUNEY et al., 2004 apud MEDRANO & BELL, 2007). A partir daí investigou-se a presença de *Pantoea agglomerans* e verificou-se por meio de postulados de Koch que a bactéria é capaz de produzir sintomas da doença em algodão cultivado em estufa. Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com este dado, pois a bactéria isolada das sementes de algodão apresentou patogenicidade em plantas de algodão cultivadas em estufa. Uma vez que essa bactéria foi isolada das sementes, provavelmente também

seja disseminada e transmitida por essas. Entretanto, faz-se necessário o estudo dessa bactéria em órgãos como capulhos, pois a doença foi relatada em tais estruturas.

4. CONCLUSÕES

A identificação das bactérias isoladas das sementes de algodão por meio do sequenciamento parcial do 16S do DNAr é similar as sequências disponíveis no GeneBank para as bactérias *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *punicae*.

CAPITULO III

VALIDAÇÃO E APRIMORAMENTO DE MEIOS DE CULTURA SEMI-SELETIVOS PARA RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* DE SEMENTES DE ALGODÃO

RESUMO – A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) responsável pela mancha angular do algodoeiro é veiculada por sementes, a principal fonte de inóculo. A utilização de cultivares resistentes e de sementes certificadas são primordiais para o controle da doença. Nesse sentido, a análise sanitária das sementes é indubitavelmente uma forma de evitar a disseminação dessa bactéria. Esse trabalho buscou avaliar e/ou aprimorar os meios de cultura semi-seletivos descritos na literatura para o desenvolvimento de *Xcm* bem como avaliar as formas de extração das bactérias em sementes inoculadas artificialmente, observando os critérios de sensibilidade, precisão e facilidade operacional. Utilizou-se a bactéria IBSBF 1880 para inocular as sementes, por meio de imersão, de restrição hídrica e por pressão a vácuo. A detecção da bactéria foi nos meios de cultura 523, 523 modificado, PSA+, NA+, MSXM e MSS. Avaliaram-se os procedimentos de assepsia e centrifugação. Os resultados obtidos permitiram determinar os meios de cultura 523 modificado e PSA+ apresentaram desempenho semelhante entre si, em comparação com os meios 523, nutriente ágar, MSXM e MSS, que nem sempre as colônias de *Xcm* apresentaram características distintas de outras bactérias. Nos procedimentos de extração das bactérias das sementes,

a utilização de centrifugação permite a recuperação de maior número de UFC/mL. Ressalta-se que a utilização de meios de cultura semi-seletivos em rotina laboratorial é indispensável, pois mesmo sendo um processo laborioso, apresenta várias características que são desejáveis na determinação de bactérias associadas às sementes.

Palavras-chave: Detecção, sensibilidade, inoculação artificial

ABSTRACT - The *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) responsible for the blight of cotton is propagated by seeds, the main source of inoculum. The use of resistant varieties and certified seed are essential to control the disease. In this sense, the seed health analysis is undoubtedly a way to prevent the spread of bacteria. This study aimed to evaluate and / or improve the culture media semi-selective in the literature for the development of Xcm and evaluate ways to extract the bacterium in artificially inoculated seeds, observing the criteria of sensitivity, accuracy and ease of operation. The bacterium used to inoculate 1880 IBSBF seeds, by dipping, and fluid restriction vacuum pressure. The detection of bacteria in culture media was 523, 523 modified, PSA +, Na +, and MSXM MSS. We assessed the aseptic procedures and centrifugation. The results obtained allowed to determine the culture media and PSA modified 523 + showed similar performance to each other, compared with 523 media, nutrient agar, MSXM and MSS, that not all the colonies of Xcm showed characteristics distinct from other bacteria. In the procedures of extraction of seeds of bacteria, the use of centrifugation enables recovery of a greater number of CFU/ml. It should be noted

that the use of culture media in routine laboratory-selective it is essential that even though a laborious process has several characteristics that are desirable in the determination of bacteria associated with the seed.

Key Words: Detection, sensitivity, artificial inoculation

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro é uma doença incitada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Smith) (SCHAAD et al., 2006). Essa doença afeta o algodoeiro em todas as suas fases de desenvolvimento vegetativo, folhas, ramos, caules e capulhos. Os sintomas normalmente apresentam-se como lesões encharcadas e angulosas ao longo das nervuras. É comum a coalescência das lesões, necrose e posterior rasgadura do limbo foliar (CIA & SALGADO 1997).

É uma doença importante que pode levar a danos de 10 a 20%. A intensidade da doença dependendo das condições climáticas favoráveis e também conforme a susceptibilidade da cultivar utilizada (ALMEIDA et al., 2008).

Outro fator importante para a intensidade da doença é a presença de raças virulentas da bactéria. Conforme relatam Hunter et al., (1968), as raças de *X. citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) variam conforme a habilidade de induzir doença em diferentes variedades de algodoeiro. No mundo foram identificadas mais de 20 raças fisiológicas de *Xcm* (BIRD et al., 1981). Estirpes altamente virulentas foram identificadas na África na década de 1980, sendo classificadas como as raças 20, 21 e 22. Estudos da variabilidade dos isolados ocorrentes no Brasil indicam estreita variabilidade sendo a raça 18 de maior predominância (CIA & SALGADO 1997; NUNES et al., 2003; DELANNOY et al., 2005).

A semente é o meio mais eficiente de disseminação e sobrevivência dessa bactéria constituindo-se na principal fonte de

inóculo para áreas consideradas isentas desse patógeno. *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* pode ocorrer em sementes produzidas por plantas sintomáticas e/ou assintomáticas, estando associada à semente, tanto interna quanto externamente, e a sua instalação depende basicamente de temperatura e umidade do solo. Não raramente pode ocorrer o apodrecimento das sementes presentes no solo, mesmo antes da germinação, constituindo-se em fonte de inóculo para novas plantas (BRINKERHOFF & HUNTER, 1963).

As medidas de controle são preventivas e praticamente inexistentes, uma vez que a mancha angular esteja instalada. Ressalta-se que as principais formas de controle são a resistência genética e a utilização de sementes certificadas. Quando estes atributos são negligenciados a ocorrência de epidemias torna-se comum.

Devido a doença não ser satisfatoriamente controlada pelo uso de produtos químicos, o controle preventivo por meio de sementes isentas de *Xcm* é dependente de métodos de detecção altamente sensíveis e específicos. Conforme Schaad et al. (2001) o desenvolvimento de metodologias para testes de sanidade de sementes deve levar em consideração as formas de extração da bactéria, a identificação da espécie e ainda a determinação da sensibilidade e níveis de tolerância. Dessa forma, para as análises de rotina, é fundamental que métodos sejam sensíveis e reproduzíveis.

A utilização de meios de cultura é uma das práticas mais corriqueiras na microbiologia, estando entre as formas mais acessíveis para a detecção de bactérias. Conforme relatam Klement et al. (1990), Romeiro (2001) e Denardin et al. (2004) características como seletividade e eficiência na detecção da bactéria são critérios

primordiais na determinação de um meio de cultura semi-seletivo. Não basta que o meio seja altamente supressivo para microrganismos saprófitas e permita baixa repressividade para a bactéria fitopatogênica em análise, faz-se necessário praticidade, rapidez na obtenção de resultados, custo e facilidade de isolamento do microrganismo. Vários inconvenientes para o uso de meios de cultura em rotina laboratorial são relatados, como preparação laboriosa, demanda de tempo para o diagnóstico, reagentes importados, risco de contaminação, entre outros, ainda assim o uso é comum e rotineiro na maioria dos laboratórios. Apesar desses inconvenientes, a detecção em meio de cultura é uma ferramenta indiscutivelmente necessária. Mesmo para técnicas moleculares como, por exemplo, a Bio-PCR, faz-se o uso dos meios de cultura líquido ou agarizado para o prévio desenvolvimento da bactéria alvo presente nas sementes (SCHAAD, 2001; RANDHAWA et al., 2001).

Dentre as metodologias descritas para a detecção de *Xcm* em sementes de algodão, vários meios de cultura semi-seletivos foram elaborados ou melhorados. Entre estes, Nutriente ágar modificado (Almeida et al., 2003), PSA+ (Metha et al., 2005), meio MSS Dezordi (2006), MSXM Soares (2006) e meio 523 modificado Barbosa (2007).

Neste trabalho, avaliaram-se o desempenho, bem como formas de extração, e o aprimoramento dos referidos meios para a detecção e quantificação de *Xcm* em sementes contaminadas/infectadas artificialmente. Os critérios observados foram sensibilidade, precisão e facilidade operacional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de bacteriologia vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAMV da Universidade de Passo Fundo, no período de março de 2009 a março de 2012.

2.1 Determinação da concentração de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

A determinação da concentração de *Xcm* foi com o intuito de padronizar o inóculo a ser utilizado na contaminação artificial das sementes de algodão. A bactéria de IBSBF 1880 foi cultivada em meio 523 líquido a 28 °C sob agitação de 140 rpm durante 24 a 48 h. Após este período a suspensão foi submetida à centrifugação a 3684 xg por um período de 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células decantadas lavadas em 10 mL de solução fisiológica + 0,01% de Tween 20 (SFT) e novamente centrifugadas. Após, foram preparadas suspensões, cuja concentração foi determinada pela leitura de $DO_{580} = 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8$ e 1,0 que foram diretamente relacionadas com o número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos meios de cultura. A partir de cada suspensão várias diluições seriadas foram preparadas para que fosse possível fazer a quantificação de UFC/mL. O plaqueamento foi conforme Miles & Misra (1938) nos meios de cultura 523 de Kado & Heskett (1970), nutriente ágar modificado, Almeida et al., (2003); PSA+ de Metha et al., (2005); MSXM de Soares (2006); MSS de Dezordi (2006); e meio

523 modificado, Barbosa (2007). Para cada meio de cultura foram utilizadas três placas, as quais foram divididas em quatro quadrantes e de cada diluição foram distribuídas 3 gotas de 10 µL, constituindo-se 12 repetições para cada meio de cultura. A incubação foi em estufa bacteriológica sob temperatura a 28 °C por 24 a 48 h. Iguais concentrações foram posteriormente utilizadas para a inoculação de sementes.

2.2 Inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão

Amostras de sementes de algodão isentas de *Xcm* foram utilizadas para a inoculação por imersão, restrição hídrica e por vácuo e posterior avaliação dos meios de cultura referência para essa bactéria.

2.2.1 Inoculação por imersão

Seis sub-amostras de 1000 sementes de algodão foram previamente submetidas à assepsia e imersas nas seis diferentes concentrações bacterianas (DO₅₈₀ 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0) na proporção de 1:1 peso/volume e mantidas a 4 °C por 10 h. Após, descartou-se o excesso da suspensão e as sementes foram submetidas à secagem em câmara de fluxo laminar por 16 horas para posteriores testes de detecção.

2.2.2. Inoculação por restrição hídrica

A inoculação por restrição hídrica foi conforme Barbosa (2007). Utilizou-se meio 523 de Kado acrescido de 69,4 g/l de manitol que gera um potencial osmótico de -1,0 MPa. A bactéria padrão (IBSBF 1880) foi cultivada no referido meio por 48 horas, sob temperatura de 28 °C. As sementes, previamente submetidas à assepsia, foram distribuídas em número de 50 por placa, contendo a bactéria. As placas foram agitadas manualmente para melhor aderência da bactéria nas sementes, que permaneceram nas placas por um período de 24 h nas mesmas condições de incubação. Após este período, as sementes foram retiradas das placas e levadas para a secagem em câmara de fluxo laminar. Para simular amostras com diferentes níveis de contaminação, as sementes previamente inoculadas, foram misturadas a sementes isentas de *Xcm*, compondo níveis de amostras com 50, 25, 10 e 5% de sementes inoculadas correspondendo às amostras 1, 2, 3, e 4, respectivamente.

2.2.3. Inoculação a vácuo

Amostras de 1000 sementes foram imersas em suspensões de *Xcm* com leitura de 1,0 na DO₅₈₀ na proporção de 1:1 conforme previamente descrito no item 2.2.2. Estas sementes foram submetidas à pressão por bomba a vácuo por três pulsos de vácuo durante 5 min a uma pressão de 680 mm Hg. Após a secagem em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à detecção. As sementes assim inoculadas constituíram-se amostras com diferentes números de

sementes contaminadas com *Xcm* conforme descrito no item 2.2.2. A amostra 1 foi constituída de 100% das sementes inoculadas; a amostra 2 contendo 50% das sementes previamente contaminadas; a amostra 3 com 25% das sementes contaminadas; a amostra 4 contendo 5% das sementes contaminadas e a amostra 5 sementes sem a adição de sementes previamente contaminadas com *Xcm*.

2.3. Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes inoculadas artificialmente

A detecção de *Xcm* em sementes previamente infectadas por imersão em diferentes concentrações da bactéria padrão foi efetuada utilizando-se os mesmos meios de cultura utilizados para a determinação da concentração das suspensões puras da bactéria padrão (item 2.1).

As sub-amostras constituíram-se de 100 sementes as quais foram mergulhadas em 50 mL de solução fisiológica + Tween 20 e submetidas à agitação de 140 rpm a 4 °C durante 16 horas. A centrifugação foi por 20 minutos a 3684 xg em centrífuga (ACL PK 131R) refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram submetidos a diluições seriadas sendo que 300 µL de cada diluição foram distribuídos em três placas (100 µL/placa) para cada meio de cultura em estudo.

2.4 Quantificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes individuais

Sementes individuais, previamente inoculadas por restrição hídrica, foram analisadas para determinar o número de UFC por semente. A amostra constituiu-se de 70 sementes, sendo cada uma, colocada em tubo de ensaio, acrescidas de 1 mL de SFT e mantidas em temperatura de geladeira por 16 horas. Posteriormente, prepararam-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 100 μ L de cada diluição, os quais foram espalhados com alça de Drigalsky em meio 523 modificado. Para cada semente foram utilizadas duas placas por diluição. A incubação foi a 28 °C por 48 h contando-se o número de UFC por semente.

2.5 Procedimentos de assepsia e centrifugação para a detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

Para as amostras constituídas por diferentes percentagens de sementes inoculadas por restrição hídrica, compôs-se sub-amostras, as quais foram constituídas de 10 g de sementes. Avaliou-se a forma de extração de *Xcm* das sementes utilizando os procedimentos de assepsia e centrifugação, constituindo-se nos seguintes tratamentos: a) (T1) sem assepsia e centrifugação (SAC), b) (T2) sem assepsia e com centrifugação (SACC), c) (T3) com assepsia e sem centrifugação (CASC) e d) (T4) sementes com assepsia e centrifugação (CAC). Cada amostra, com ou sem assepsia, foi imersa em 50 mL de SFT e submetida à agitação de 140 rpm a 4 °C por 16 horas. Para os

tratamentos que foram utilizados centrifugação, a mesma foi a 3684 xg durante 20 min. O sobrenadante foi descartado sendo os sedimentos ressuspensos em 5 mL de SFT. Prepararam-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e efetuou-se o semeio de 100 μ L nos seis diferentes meios de cultura citados. Utilizaram-se três placas por diluição para cada meio de cultura.

2.6 Avaliação da sensibilidade dos meios de cultura

Para avaliar a sensibilidade dos meios de cultura e interferência da solução de extração para diferentes quantidades de sementes, foram pesados volumes relativos a 250, 500, e 1000 sementes isentas de *Xcm* e em cada amostra, foi adicionada uma semente previamente inoculada por restrição hídrica. As sementes foram colocadas em erlermeyers onde adicionou-se volume de 2:1 de SFT constituindo incidência de 0; 0,004; 0,002 e 0,001%, de semente contaminada com *Xcm*. Em outras amostras com incidências de sementes foram adicionados volumes equivalentes a 2:1 de água peptonada 1% acrescida 0,001% de ciclohexamida, (AP). Essas amostras foram mantidas em temperatura de geladeira por 16 horas. As soluções de extração foram centrifugadas e submetidas a diluições e plaqueamento nos mesmos meios de cultura já citados, sendo usadas três placas para cada diluição por meio de cultura.

2.7 Teste de germinação

As sementes inoculadas com *Xcm* por meio de imersão, por restrição hídrica e por vácuo foram analisadas quanto à

germinação e comparadas com sementes não inoculadas. O teste de germinação foi em rolos de papel umedecidos conforme Brasil (2009). A análise foi expressa em percentagem de sementes germinadas após cinco a sete dias.

2.8 Análise estatística

Os valores relativos ao número de UFC recuperados das sementes inoculadas por imersão foram correlacionados com os valores obtidos nas suspensões puras para cada meio de cultura. Para as sementes inoculadas por meio de restrição hídrica, o delineamento experimental para cada amostra de cada tratamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial. As médias de UFC foram transformadas em logaritmo de UFC/mL, analisados por análise de variância e diferenciadas por Tukey com 5% de probabilidade de erro. Os dados foram submetidos à análise estatística através do programa CoStat, CoHort Software (2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

A quantificação da bactéria tipo IBSBF 1880 determinada nos meios cultura, a partir das diferentes leituras de absorbância a 580 nm estão apresentadas na Figura 6.

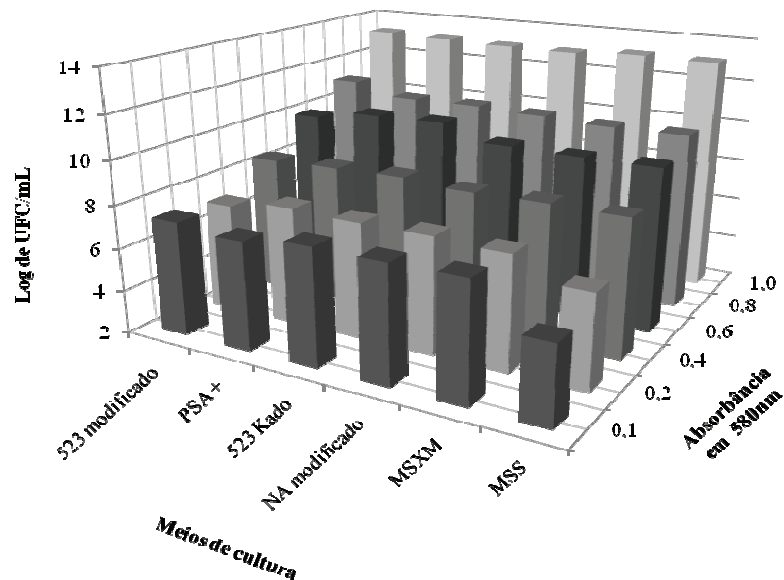


Figura 6. Número de UFC/mL de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em diferentes meios de cultura

O meio de cultura MSS (DEZORDI, 2006) apresentou maior variação para o desenvolvimento de *Xcm*, pois o crescimento mostrou-se menor que nos demais meios, principalmente a partir das leituras de absorbâncias 0,1 e 0,2 que foi de 5,58 e 6,34, ($3,8 \times 10^5$ e $2,19 \times 10^6$) log de UFC/mL, respectivamente. Uma característica importante do meio MSS é a presença da lipólise de Tween 80 por bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo que ao redor das colônias aparecem halos esbranquiçados característico do gênero. Os demais meios utilizados apresentaram-se semelhantes entre si nas diferentes concentrações de inóculo e os maiores números de UFC foram nas leituras de absorbância 1,0 em que obteve-se $1,4 \times 10^{13}$ e $1,6 \times 10^{13}$ UFC/mL nos meios 523 modificado e 523, respectivamente. O

aumento no crescimento das bactérias nos diferentes meios de cultura foi proporcional ao aumento na densidade ótica.

3.2 Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão inoculadas artificialmente por imersão

Na Tabela 6 estão apresentados os logaritmos de UFC/mL para cada leitura de absorbância de suspensões puras de *Xcm* e a recuperação a partir das sementes previamente inoculadas nas seis concentrações bacterianas. Conforme os resultados, os maiores números de UFC/mL foram obtidos nos meios 523 modificado (523m), meio PSA+, 523, seguido por NA modificado, MSXM e MSS. Observam-se correlações significativas entre o número de UFC/mL a partir de suspensões puras e extraídas das sementes para cada meio de cultura. O comportamento dos meios de cultura foi semelhante entre si, de maneira que a concentração bacteriana aumentou à medida que as sementes foram imersas, em suspensões mais concentradas, exceto para a absorbância 0,6 cuja concentração inicial foi de aproximadamente $5,2 \times 10^{10}$ UFC/mL, sendo a recuperação das sementes em torno de $1,2 \times 10^5$ UFC/mL.

Tabela 6. Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) em sementes inoculadas artificialmente por imersão em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Médias de logaritmo de UFC/mL a partir de suspensões puras/médias de UFC/mL extraídas de sementes de algodão						Correlação de Pearson
	Densidade ótica em 580 nm						
	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	
523	7,3	7,1	8,2	10,4	10,1	13,2	0,88***
	4,9	4,5	5,1	5,2	7,0	8,2	
523 modificado	7,0	7,1	8,3	10,9	10,8	13,2	0,90***
	5,0	4,1	5,2	5,5	7,1	8,8	
PSA+	7,6	7,1	8,6	10,8	10,3	13,2	0,80***
	5,0	4,1	5,2	4,9	7,7	8,8	
MSXM	7,1	7,5	8,4	10,5	10,4	13,1	0,90***
	4,0	4,0	5,1	5,0	7,0	8,1	
NA+	7,6	7,3	8,2	10,7	10,7	12,9	0,90***
	4,9	4,5	5,0	5,2	6,5	8,1	
MSS	6,2	6,5	8,4	10,3	10,3	13,0	0,85***
	4,4	3,7	5,2	4,7	6,4	7,3	

As características das colônias de *Xcm* extraídas de sementes de algodão inoculadas artificialmente podem ser observadas nos diferentes meios de cultura conforme a Figura 7.

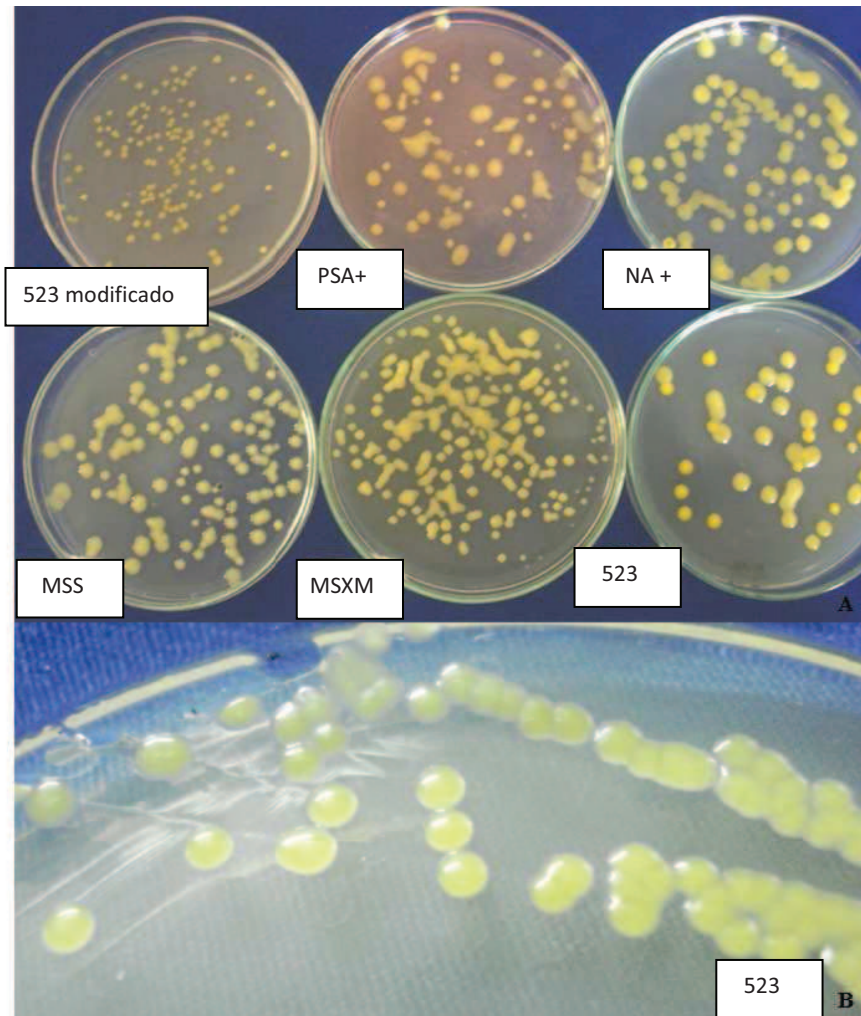


Figura 7. Aspectos culturais de colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* extraídas de sementes de algodão inoculadas artificialmente e cultivadas nos meios 523 modificado; PSA+; NA+; MSS; MSXM e 523 (A). Características das colônias do padrão IBSBF 1880 em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) (B).

3.1 Detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão inoculadas artificialmente por restrição hídrica

Na avaliação das amostras inoculadas/contaminadas artificialmente, constituídas por diferentes incidências de sementes previamente contaminadas com *Xcm* por restrição hídrica, verificou-se que a melhor forma de extração da bactéria foi mediante ausência de assepsia e uso de centrifugação (SACC), pois permitiu a recuperação de maior número de UFC nos meios de cultura 523, 523 modificado, PSA+ e Na modificado, conforme Tabela 7. Porém, nos meios de cultura MSXM, seguido pelo MSS, nas quatro formas de extração, houve um menor desenvolvimento de *Xcm*. Verifica-se que a centrifugação é importante para concentrar o inóculo presente nas sementes. Agostini (2004), detectou 4×10^4 comparado a 7×10^3 UFC/mL de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, (VALTERIM et al., 1995) com e sem o procedimento de centrifugação, respectivamente.

Nas amostras 2, 3 e 4 não houve desenvolvimento de colônias da bactéria nos mesmos meios quando se utilizou assepsia e sem a centrifugação (CASC), assim como ocorreu na amostra 4 quando não se utilizou assepsia e nem centrifugação (SASC). O objetivo da assepsia é a redução de microrganismos contaminantes presentes na amostra de forma que estes não interfiram negativamente na análise, porém, o procedimento da assepsia pode eliminar a bactéria alvo a ser detectada, uma vez que as mesmas estejam associadas externamente a semente (SCHAAD, 2001).

Tabela 7. Efeito dos meios de cultura e da forma de extração para a detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes inoculadas artificialmente por restrição hídrica

Meios de cultura	Sementes de algodão			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
523	4,40 a	4,36 a	4,47 a	4,30 a
523 modificado	4,16 a	3,88 a	4,10 a	3,97 a
PSA+	4,38 a	4,19 a	4,05 a	4,16 a
NA+	4,16 a	4,07 a	3,99 a	3,81 a
MSXM	2,75 b	2,33 b	2,08 b	0,82 c
MSS	2,16 b	1,87 b	1,32 b	1,64 b
Métodos de extração				
Sem assepsia e centrifugação	3,70 b	3,13 c	3,00 b	3,08 ab
Sem assepsia e com centrifugação	4,55 a	4,46 a	3,60 a	3,54 a
Com assepsia e centrifugação	3,20 b	2,81 c	3,37 ab	2,70 b
Com assepsia e sem centrifugação	3,70 b	3,60 b	3,37 ab	3,14 ab
Coefficiente de variação (%)	23,33	29,88	28,40	30,00

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 0,05% de significância. Meios de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970); 523 modificado (Barbosa, 2007); PSA+ (Metha et al., 2005); NA modificado (Almeida et al., 2003); MSXM (Soares, 2006); MSS, (Dezordi, 2006).

Da mesma forma o processo de extração das bactérias das sementes pode influenciar na eficiência da seletividade do meio de cultura. A baixa detecção ou ausência de crescimento de *Xcm* pode estar relacionada com a seletividade do meio de cultura. Fontes de

carbono, de nitrogênio, presença e concentração de antibióticos, condições osmóticas altas dada pela concentração de açúcares, níveis de pH e temperatura de incubação permitem o desenvolvimento dos microrganismos alvos, inibindo os demais. Em alguns casos o nitrogênio pode ser utilizado como fonte de carbono e isso pode afetar negativamente a seletividade do meio de cultura (CHANG et al., 1991; GITAITIS & WALCOTT 2007).

Diferentes períodos e temperaturas pelas quais as sementes são imersas em diferentes soluções de extração podem interferir na recuperação ou extração das bactérias das sementes. Outros processos como a trituração das sementes, filtragem da solução de extração, etapas de centrifugação com intuito de concentrar as células da bactéria alvo, buscam a eficiência do método de plaqueamento em meio semi-seletivo (FATMI & SCHAAD, 1988; RANE & LATIN, 1992). Em estudo com sementes de tomate, Hadas et al., (2005) verificaram que o processo de centrifugação aumentou em cerca de 10 vezes o limite de detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de uma única semente contaminada em uma amostra contendo 5000 sementes.

Os meios de cultura 523, 523 modificado, PSA+ e NA modificado permitiram desempenho semelhante para a recuperação de *Xcm*. Destaca-se que nos meios 523 modificado e PSA+, as colônias apresentam menores quantidades de polissacarídeos, o que facilita a contagem, além de uma maior inibição da presença de microrganismos contaminantes. Baixo nível de contaminação com fungos foi verificado pelos autores das modificações dos referidos meios de cultura. Tais características se devem à presença de

diferentes fontes de carbono, de antibióticos e de fungicidas nos respectivos meios, cuja função principal é a redução de contaminantes e/ou estímulo ao desenvolvimento da bactéria alvo.

Metha et al. (2005) verificaram crescimento mais rápido, colônias maiores de *Xcm* e satisfatória inibição de microrganismos contaminantes presentes nas sementes de algodão no meio semi-seletivo PSA+ comparado com o meio nutriente ágar. Com esse meio semi-seletivo os autores determinaram que a bactéria pode sobreviver infectando as sementes por no mínimo 28 meses, em condições de temperatura de 5 °C. Porém em condições ambientais em torno de 24 °C não se tem relatos do tempo de sobrevivência de *Xcm*.

Pelos resultados verificados na Tabela 7 pode-se inferir que a inoculação por restrição hídrica promove não somente a associação da bactéria à superfície externa da semente, mas também interna, pois com a assepsia, não houve decréscimo acentuado do número de UFC em relação àquelas sementes que não foram submetidas à assepsia. A técnica de restrição hídrica em substrato agarizado controlada pela adição de solutos como açúcares ou sais, favorece o processo de inoculação das sementes, pois permite que as mesmas fiquem por maior tempo em contato com o patógeno, já que acontece diminuição ou inibição do processo germinativo das mesmas (TEIXEIRA et al., 2005).

Nas amostras avaliadas com diferentes incidências de sementes contaminadas, verificou-se que o número de UFC permaneceu semelhante entre as amostras, provavelmente em função de diferenças do nível de inóculo em cada semente, conforme foi verificado na análise individual de sementes, que apresentavam

diferentes números de UFC, variando entre $4,0 \times 10^5$ a $1,3 \times 10^7$ com média de $6,0 \times 10^6$ para sementes sem assepsia e para sementes individuais com assepsia entre 3×10^3 a $6,1 \times 10^5$ com média de $7,2 \times 10^4$ UFC/semente.

Os resultados apresentados na Figura 8 mostram a detecção de *Xcm* obtida a partir de uma semente contaminada entre 250, 500 e 1000 sementes isentas da referida bactéria. As concentrações mais altas de *Xcm* foram obtidas no tratamento T5, cujo número de sementes era de 250 e a solução de extração foi água peptonada.

Conforme as Figuras 9 e 10 os tratamentos T1 e T5 (250 sementes em SFT e 250 sementes + AP) o meio MSXM comportou-se de forma semelhante, cujo o número de UFC foi de 4×10^3 , mas ocorreu decréscimo no desenvolvimento de *Xcm* nos meios 523 modificado e PSA+ no tratamento T1. Em relação aos tratamentos T2 e T6 (500 sementes em SFT e AP, respectivamente) maiores concentrações de *Xcm* foram verificadas no tratamento T6, cujo número de UFC foi de $4,2 \times 10^3$ no meio 523 modificado e entre 3 e $3,3 \times 10^3$ para os meios PSA+ e MSXM. O mesmo comportamento foi verificado entre os tratamentos T3 e T7, exceto no meio PSA+. As maiores concentrações de bactérias recuperadas foram naquelas amostras cujas sementes foram imersas em água peptonada. Isso ocorreu, provavelmente porque a solução de extração promoveu a recuperação das atividades metabólicas da bactéria. Outro fator que pode ter favorecido este aumento é o nível de contaminação inicial da semente previamente inoculada por restrição hídrica, já que este é

variável, conforme foi verificado na determinação do número de UFC/semente na análise individuais das sementes.

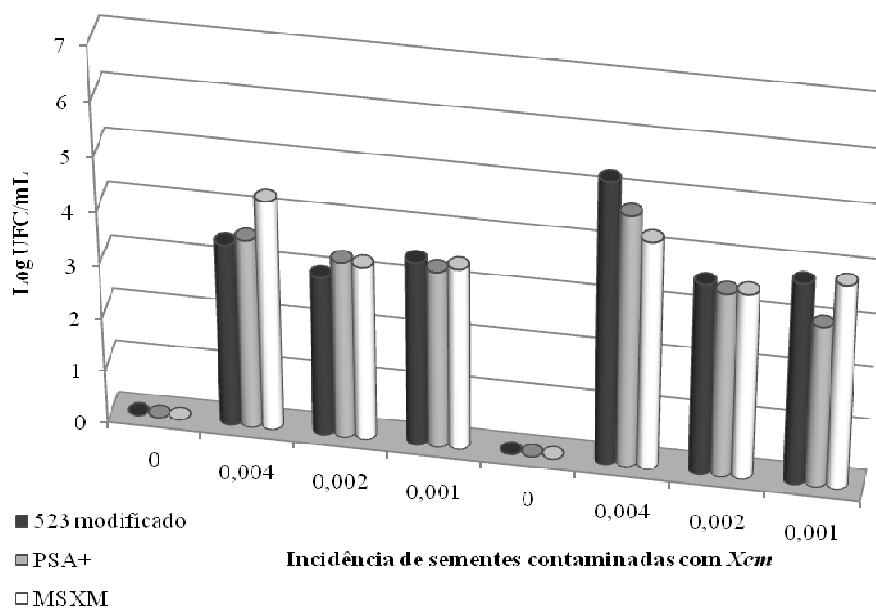


Figura 8. Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* em sementes com diferentes níveis de incidência.

A recuperação de *Xcm* nos meios 523, MSS e Na modificado não foi verificada neste ensaio, pois houve excesso de contaminação com outros microrganismos conforme Figura 10. A presença de contaminantes é comum mesmo em sementes inoculadas artificialmente. O meio 523 não possui antibióticos ou fungicidas na sua composição e por isso o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis é comum. O meio MSS contém cefalexina, tiofanato metílico e clorotalonil, além de cristal violeta.

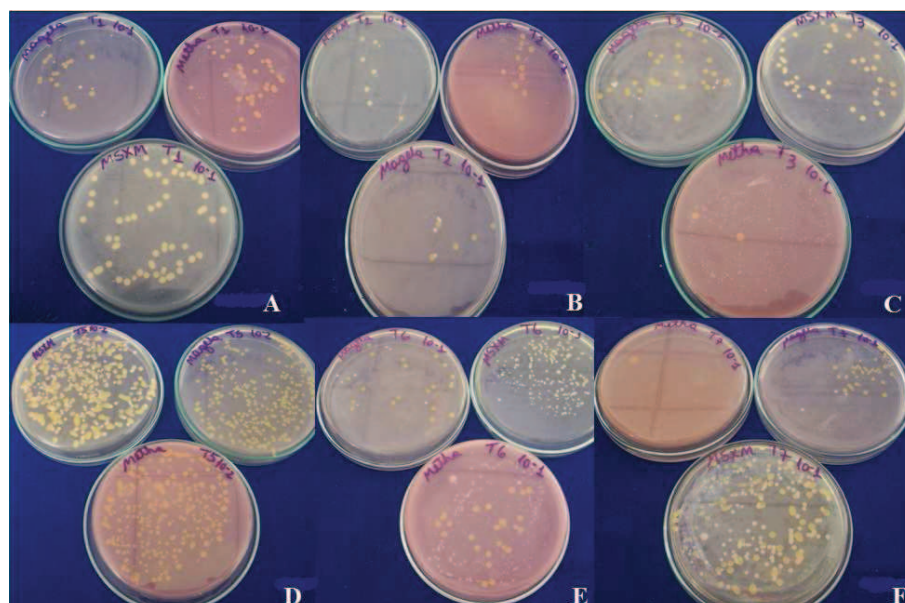


Figura 9. Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* nos meios 523 modificado, MSXM e PSA+; A) T1; B) T2; C) T3 - sementes imersas em SFT - D) T5; E) T6; F) T7 - sementes imersas em água peptonada.

O antibiótico cefalexina inibe crescimento de alguns isolados de *Xcm* quando em concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, porém na composição de MSS é utilizada a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e essa concentração não inibe o desenvolvimento de *Xcm* no meio de cultura. Contudo, Dezordi (2006) verificou que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de cefadroxil suprimiu em 20% o crescimento de *Xcm* e em 50% quando a concentração foi aumentada para 100 $\mu\text{g/mL}$. Em adição, o antibiótico cefalexina em concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ associado aos fungicidas tiofanato metílico e clorotalonil (10 $\mu\text{g/mL}$) na composição do meio de cultura NSA levou a inibição do crescimento de um isolado de *Xcm*. Mas, a redução de cefalexina para 50 $\mu\text{g/mL}$

associada aos mesmos fungicidas e concentração não inibiu o crescimento de *Xcm*.

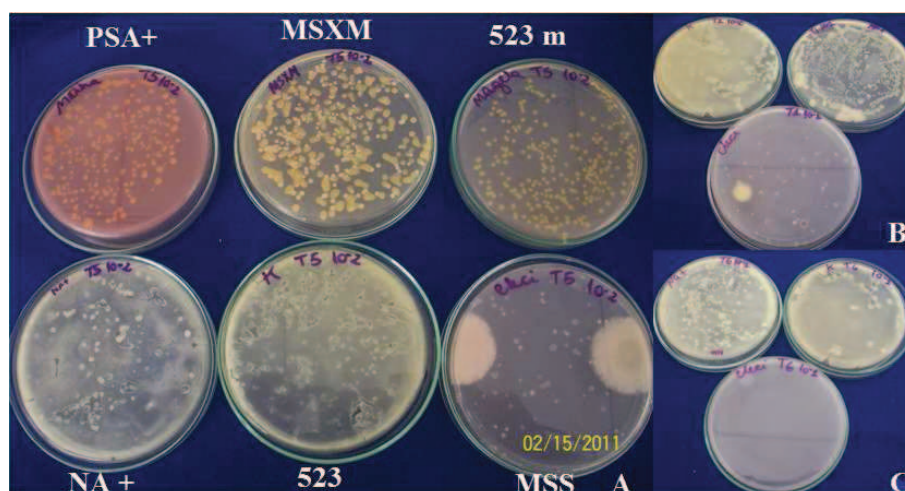


Figura 10. Comportamento dos meios de cultura 523, NA modificado, e MSS a partir de diferentes números de sementes. A) T5, B) T1; C) T6

A presença de microrganismos saprófitas em sementes naturalmente contaminadas pode interferir no desenvolvimento de *Xcm* sobre os meios seletivos. Além disso, amostras de sementes portadoras de baixo nível de contaminação com *Xcm* podem não permitir a detecção eficiente da bactéria alvo, de modo que o método apresente baixa sensibilidade (BRINKERHOFF & HUNTER, 1968).

Conforme os resultados verificados nesse estudo, independentemente do meio de cultura utilizado, a detecção de *Xcm* foi obtida em amostras de semente contaminadas com 0,4; 0,2 e 0,1% de incidência. A detecção da referida bactéria foi verificada por Dezordi (2006) no meio MSS, em amostras de semente contendo 0,1% de infecção. Resultados mais sensíveis ainda foram obtidos por

Metha, et al., (2005) que detectaram a bactéria em amostras contendo 0,05% de infecção utilizando o meio semi-seletivo PSA+. Contudo, os autores relatam que não foi possível correlacionar os níveis de infecção das sementes com níveis de severidade da doença no campo.

Alguns trabalhos mostram que a solução de imersão das sementes pode favorecer ou não a extração das bactérias das mesmas. Randhawa et al. (2001) verificaram o efeito do tampão fosfato na sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, demonstrando que houve um decréscimo na população quando imersas por 4 horas nesse tampão. Quando a população bacteriana presente nas sementes é baixa, é indicada a utilização de meio de enriquecimento para a posterior detecção da bactéria. O inconveniente é que esse meio favorece também o desenvolvimento de microrganismos contaminantes. Níveis de contaminação de sementes com bactérias fitopatogênicas normalmente são baixas conforme relata Randhawa, et al. (2001), por exemplo, para *A. avenae* subsp. *citrulli* em lote de 10000 sementes de melão encontraram entre 1 a 7 sementes contaminadas, mas o nível de inóculo por semente varia, contendo até 300 células que podem ser detectadas por plaqueamento em meio de cultura ou por bio-PCR, desde que o tampão de extração não exceda 30 mL. Os mesmos autores demonstraram a relação entre número de sementes e volume de tampão de extração que podem apresentar resultados falsos negativos. Eles verificaram que em triplicatas de amostras com 200 e 2000 sementes imersas em 30 e 200 mL de tampão, respectivamente, os resultados por bioPCR foram positivos nas três amostras imersas em 30 mL em contraste com apenas uma amostra positiva para 2000 sementes quando imersas em 200 mL de

tampão. O volume de solução de extração utilizado no presente estudo foi de 0,5 mL/semente e não seguiu a mesma relação que os autores relataram de 0,1 mL/semente. Deve-se levar em conta o tamanho da semente. O volume de tampão utilizado poderia ser reduzido, entretanto algumas sementes absorvem mais de água.

3.2 Quantificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes inoculadas a vácuo

Os meios utilizados para a recuperação de *Xcm* foram 523, 523 modificado, PSA+ e MSXM (sem a adição de ampicilina e com a substituição de dextrose por sacarose). Os demais meios MSS e Na modificado não foram utilizados em função da inconstância nos resultados obtidos a partir das sementes inoculadas nos experimentos anteriores.

Na Tabela 8 são apresentados o logaritmo de unidades formadoras de colônias isoladas das amostras 1, 2, 3 e 4. A maior concentração bacteriana foi detectada na amostra 1 que apresentava 100% das sementes inoculadas com *Xcm*. Nas amostras 2, 3 e 4 menores números de UFC devem-se ao nível de contaminação de 50%, 25% e 5% das sementes.

Tabela 8. Detecção e quantificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão inoculadas a vácuo

Meio de cultura	Tratamento/incidência de sementes contaminadas			
	100	50	25	5
523	A 7,72 a	B 3,62 b	C 2,93 ab	C 2,96 ab
523 modificado	A 7,68 a	B 4,71 a	CD 2,60 b	C 2,95 ab
PSA+	A 7,75 a	B 3,87 b	CD 2,71 ab	C 3,12 a
MSXM	A 5,91 b	B 3,10 c	D 2,26 c	C 2,56 c

Logaritmo das médias em maiúsculas e em minúsculas seguidas da mesma letra na linha e na coluna, respectivamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05% de significância. Meios de cultura 523 de Kado e Heskett (Kado & Heskett, 1970); 523 de Kado e Heskett modificado (Barbosa, 2007); PSA+ Peptona-sacarose-ágar, (Metha et al., 2005); MSXM (Soares e Denardin, 2006).

A recuperação de *Xcm* foi semelhante nos meios 523, 523 modificado e PSA+ para todas as amostras cuja maior concentração bacteriana foi $5,72 \times 10^7$ UFC/semente no PSA+, comparada a menor concentração obtida no meio MSXM que foi de $8,13 \times 10^5$ UFC/semente para a amostra 1, e a mesma tendência foi verificada entre as demais amostras. O que se destaca é que nos meios 523 modificado e no PSA+ as colônias desenvolvem-se entre 3 a 6 dias após a incubação e as características das colônias são coloração amarela, com aspecto brilhante e mucóides, porém sem excesso de polissacarídeo, o que facilita a contagem das colônias, principalmente quando o nível de contaminação é alto. Conforme vários autores afirmam, fatores primordiais na determinação de um bom meio de cultura para rotina é a sua praticidade de preparo, custo dos reagentes,

sensibilidade e rapidez de crescimento da bactéria alvo. Tais características são observáveis no meio 523 modificado.

O meio PSA+ foi avaliado para a detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de sementes de feijão. O crescimento da bactéria a partir das sementes infectadas ocorreu após seis a 12 dias de incubação e a frequência da bactéria variou entre 30 a 112% entre nas amostras avaliadas (LOPES et al., 2008). O crescimento de *Xcm* obtido no presente trabalho foi verificado entre quatro a seis dias após a incubação. Esse período não é desejável em rotina laboratorial, ainda mais que após o crescimento da bactéria em meio de cultura, faz-se necessária a identificação e/ou determinação de patogenicidade, processos que demandam tempo.

Nos meios utilizados, a presença de bactéria saprófitas foi baixa, provavelmente devido às sementes serem submetidas à prévia assepsia antes da contaminação artificial com *Xcm*. Outro fator é a composição dos referidos meios de cultura, que são acrescidos de antibióticos e fungicidas, que facilitam a inibição do desenvolvimento de saprófitas. Características já bem definidas por Klement et al. (1990) que relatam que a inclusão de fontes de carbono específicas, de antibióticos, corantes, ou outros compostos inibidores em um meio de cultura semi-seletivo, aumenta a distinção entre as bactérias patogênicas das não patogênicas.

Conforme Dezordi et al. (2010) o meio de cultura MSS é um meio semi-seletivo indicado para a rotina de detecção de *Xcm* em sementes de algodão como forma para a prevenção de epidemias de mancha angular, pois detectou baixos níveis de *Xcm* em amostras contendo 0,1% de incidência. No presente estudo, a detecção de *Xcm*

nesse meio não foi semelhante aos resultados verificados pela autora. Ainda que os resultados verificados pela autora fossem obtidos a partir de sementes naturalmente contaminadas. O fato do baixo desenvolvimento de *Xcm* no meio MSS indica baixa recuperação de células viáveis. Talvez em função de diferenças de sensibilidade das bactérias aos fungicidas e ou antibióticos, pois conforme estudos realizados por Dezordi (2006) essa bactéria apresenta ampla variação quanto à sensibilidade a antibióticos e fungicidas.

Ressalta-se que a maioria das bactérias Gram negativas, dentre essas, o gênero *Xanthomonas*, apresentam a habilidade de manterem-se viáveis sob condições adversas, e não apresentarem colônias em meio de cultura, entrando em estado de células viáveis, mas não culturáveis (VBNC) (MCDOUGALD et al., 1998; GHEZZI & STECK, 2001).

Independentemente das formas de inoculação das sementes, o desenvolvimento de *Xcm* nos meios de cultura foram observados após 2 até 6 dias após a incubação, sendo o crescimento mais rápido nos meios 523, NA modificado, MSXM e 523 modificado. O crescimento mais lento foi nos meios PSA+ e MSS, levando em torno de quatro a cinco dias para o desenvolvimento das colônias. Os resultados verificados concordam com os de Dezordi (2006), Soares (2006) e Barbosa (2007) que relatam que os meios de cultura podem ser utilizados em análise de rotina para a detecção do agente causal da mancha angular do algodoeiro, mostrando-se eficiente em sementes naturalmente contaminadas.

O teste de germinação das sementes em papel (Tabela 9) demonstrou que a inoculação por imersão promoveu redução na

germinação, pois o método favorece o processo de embebição da semente e isso promove modificações fisiológicas nas mesmas. Nas demais formas de inoculação, não houve grandes reduções na germinação. Por estes resultados, a inoculação por imersão não é satisfatória, pois as sementes perdem mais rapidamente seu poder germinativo e isso impossibilita o uso posterior para semeadura. Estudos de transmissão para a determinação da epidemiologia da doença são inviáveis por esse método, uma vez que a associação da bactéria ocorre na parte externa da semente fazendo com que as mesmas sobrevivam associadas às sementes por períodos muito curtos (MACHADO, 1988; VALARINI & MENTEN, 1991).

Tabela 9. Germinação de sementes de algodão em rolo de papel filtro

Forma de inoculação	Porcentagem de sementes germinadas	
	Com inoculação	Sem inoculação
Imersão	51	85
Restrição hídrica	81	88
Vácuo	92	94

4. CONCLUSÕES

Os meios de cultura testados mostram-se na sua maioria eficientes para a recuperação de *Xanthomonas* associada às sementes. Destaca-se os meios de cultura 523 modificado e PSA+ com melhor desempenho para a detecção de *Xanthomonas citri* subsp.

malvacearum em comparação aos meios 523, nutriente ágar modificado, MSXM e MSS.

A utilização da centrifugação promove a concentração das células bacterianas presente nas amostras, facilitando a detecção das bactérias.

A inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes, por restrição hídrica e pela inoculação a vácuo não interfere na germinação das sementes sendo recomendados para testes de transmissão.

CAPITULO IV

TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* DE SEMENTES PARA PLANTAS DE ALGODÃO

RESUMO: As sementes constituem o meio mais eficiente de sobrevivência e disseminação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. Os primeiros sintomas da mancha angular do algodoeiro, provenientes de sementes infectadas, podem ser verificados nos cotilédones, cujas lesões normalmente apresentam aspectos oleoso evoluindo para queima ou crestamento das foliar. Essa doença afeta todos os órgãos da planta e leva a intensos danos associados às características ambientais de umidade e temperatura. A transmissão dessa bactéria de sementes para plantas de algodão foi avaliada entre os meses de dezembro a janeiro nos anos de 2011 e de 2012. Sementes de cultivares DeltaOpal, Ita 90, e BRS Ipe foram inoculadas artificialmente com a finalidade de estimar a transmissão dessa bactéria de sementes contaminadas artificialmente para plantas. A inoculação das sementes foi por imersão, durante 3 horas, em seis diferentes concentrações bacterianas, $2,2 \times 10^7$, $2,9 \times 10^7$, $2,8 \times 10^8$, $5,5 \times 10^{10}$, $9,9 \times 10^{11}$ e $1,3 \times 10^{13}$ UFC/mL. As sementes inoculadas por restrição hídrica foram misturadas a sementes isentas de *Xcm* constituindo amostras de 100, 50, 25, 10 e 0% de sementes contaminadas. Para as sementes inoculadas a vácuo foram utilizadas três suspensões bacterianas, as quais continham concentrações de $(2,1 \times 10^7$, $5,2 \times 10^{10}$ e $1,2 \times 10^{13}$ UFC/mL). As sementes foram semeadas em bandejas contendo substrato comercial (Technomax ®) e mantidas

em casa de vegetação. A quantificação de UFC das sementes foi em meio de cultura 523 modificado. As avaliações constaram do número de sementes germinadas, e das plantas contendo lesões da mancha angular. As plantas que apresentaram sintomas foram coletadas e submetidas à confirmação do agente etiológico mediante isolamento em meio de cultura 523. O inóculo da bactéria na semente variou entre 4×10 a $3,1 \times 10^8$ UFC/mL. As formas de inoculação bem como as doses do inóculo presentes nas sementes não influenciaram a taxa de transmissão da bactéria para semente, sendo a percentagem de plantas infectadas entre 0,021 a 0,15 nas sementes inoculadas por vácuo e por restrição hídrica, respectivamente

Palavras-chave: patologia de sementes, mancha angular, inoculação

ABSTRACT: The seeds are the most efficient means of survival and spread of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. The first symptoms of angular leaf spot of cotton from infected seeds can be checked in the cotyledons, whose lesions usually present aspects evolving to burning oil or of leaf blight. This disease affects all organs of the plant and leads to severe environmental damage associated with the characteristics of humidity and temperature. The transmission of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* seed to cotton plants was evaluated during the months from December to January in the years 2011 and 2012. Seeds of cultivars DeltaOpal Ita 90 and BRS Ipe were artificially inoculated with the purpose of estimating the transmission of the bacteria from artificially contaminated seeds to plant. The seed was inoculated by immersion, for 3 hours, in six different bacterial

concentrations, (2.2×10^7 , 2.9×10^7 , 2.8×10^8 , 5.5×10^{10} , 9.9×10^{11} and 1.3×10^{13} CFU/ml). The inoculated seeds were mixed to water stress-free seed *Xcm* samples representing 100, 50, 25, 10 and 0% of contaminated seed. For seed inoculated vacuum three bacterial suspensions were used, which contain concentrations of 2.1×10^7 , 5.2×10^{10} and 1.2×10^{13} CFU/mL. The seeds were sown in trays containing commercial substrate and incubated. Quantification of CFU of seed culture medium was changed 523. The evaluations consisted of the number of germinated seeds, and plants containing lesions characteristic of blight. The plants showing symptoms were collected and subjected to confirmation by isolation of the etiologic agent in culture medium 523. The inoculum of bacteria in the seed ranged from 4×10 to 3.1×10^8 CFU/mL. The forms of inoculation and doses of inoculum in the seeds did not affect the transmission rate of the bacterium to seed, and the percentage of infected plants from 0.021 to 0.15 in the seeds inoculated by vacuum and fluid restriction, respectively

Key words: seed pathology, angular leaf spot, inoculation

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* é uma doença que potencialmente é fator limitante, dependendo da cultivar utilizada e das características ambientais durante o cultivo.

As fontes de inóculo mais comuns dessa bactéria são restos culturais e sementes, sendo a última, a principal forma de disseminação para novas áreas. A sobrevivência nos restos culturais é em torno de cinco meses ou até sua completa degradação, porém, há alguns relatos de permanência no solo por até onze anos. Nas sementes a bactéria sobrevive por até quatro anos, e mesmo após o deslincamento ácido, permanece por no mínimo quatro meses (KIRKPATRICK & ROTHROCK, 2001; CIA & SALGADO, 2005; AARON, 2009). As sementes contaminadas fazem parte do primeiro estágio da epidemia, uma vez que a transmissão acontece da semente para a planta. Nas lesões normalmente aparecem os exsudatos da bactéria e que com os respingos de chuva são dispersos para novas plantas, desenvolvendo a epidemia, podendo contaminar as sementes quando os capulhos estão maduros.

Os estudos de transmissão são importantes para determinar a epidemiologia de uma doença, uma vez que as sementes veiculam as bactérias e a porcentagem de infecção é dependente do nível de contaminação das mesmas (SCHNATHORST, 1964; ROBERTS et al., 1996). A intensidade da doença depende de inúmeros fatores como a interação patógeno-hospedeiro, podendo variar conforme as condições climáticas, nível de inóculo na semente,

suscetibilidade ou tolerância do hospedeiro, fertilidade, raças virulentas do patógeno, entre outros (HUNTER & BRINKERHOFF, 1964).

Na transmissão de *Xcm* da semente para a planta normalmente os sintomas são observados nos cotilédones, após a germinação. Segundo Roberts (1992) o surgimento das primeiras lesões foram verificados por volta de 10 dias após o plantio. A probabilidade da transmissão é estimada em relação à proporção de sementes que germinaram e apresentam sintomas da doença.

As características ambientais, que favorecem a mancha angular é umidade relativa acima de 70% e temperaturas acima de 25 °C e não superiores a 38 °C por mais de 12 horas. A faixa de temperatura que acelera o desenvolvimento da infecção é entre 30 a 36 °C. Tais características além de molhamento foliar, por neblina, nevoeiro, água da chuva ou de irrigação, orvalho intenso favorecem a doença, inclusive em variedades consideradas resistentes (CIA & SALGADO, 1995; KIRKPATRIK & ROTHROCK, 2001).

De acordo com vários autores, a transmissão de bactérias das sementes para a planta é normalmente muito baixa, menor do que 1% e uma única planta infectada pode causar um surto epidemiológico associado aos vários fatores que estimulam o desenvolvimento da doença (ROTH, 1989; SAETTLER, 1989; SCHAAD, 2001; SCHAAD, 2001). Especificamente no caso de doenças causadas por bactérias e vírus, existem relativamente poucos exemplos que relacionam os níveis de contaminação das sementes com os níveis da doença no campo. A maior parte dos estudos são para doenças de etiologia fúngica. Em geral, os resultados são apresentados em

percentagem de sementes infestadas relacionados à percentagem de incidência da doença (ROBERTS, 1999). No caso específico da mancha angular do algodoeiro, há poucos estudos sobre a transmissão a partir das sementes. A finalidade desse estudo foi verificar a transmissão de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* de sementes para plântulas de algodão, inoculadas artificialmente com diferentes incidências.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação do Centro de Biotecnologia na Agricultura – cebtecAGRO, em Coxilha, nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro dos anos de 2011 e 2012.

2.1 Inoculação das sementes

As sementes foram obtidas da Fundação MT do Mato Grosso e EMBRAPA algodão. Num primeiro momento foram realizados testes de detecção para a verificação de contaminação natural com *Xcm* e uma vez que a ausência da bactéria foi constatada, procedeu-se a inoculação com a bactéria *Xcm* IBSBF 1880 por meio de três formas de inoculação: imersão, restrição hídrica e por vácuo.

Os primeiros ensaios para a transmissão nos meses de janeiro e fevereiro de 2011 foram mediante uso de sementes inoculadas por imersão. Seis suspensões de *Xcm*, padronizadas em espectrofotômetro, com leituras de absorbância em 580 nm, de 0,1;

0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0. Essas leituras correspondiam $2,2 \times 10^7$, $2,9 \times 10^7$, $2,8 \times 10^8$, $5,5 \times 10^{10}$, $9,9 \times 10^{11}$ e $1,3 \times 10^{13}$ UFC/mL, respectivamente em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970). A cultivar foi DeltaOpal. As amostras de 1000 sementes foram imersas nas suspensões na proporção de 2:1 e mantidas em temperatura 8 °C por três horas. Para o controle negativo, as sementes foram mantidas por igual período em solução fisiológica. Após esse tempo, parte foi imediatamente submetida ao plantio e parte deixada para secar e para a posterior avaliação do número de UFC por semente.

Para a inoculação por restrição hídrica foi utilizado meio com potencial hídrico de -1,0 MPa conforme Barbosa (2007). As sementes foram das cultivares Ita 90 e FMT 709, consideradas suscetível e resistente a mancha angular, respectivamente. Após assepsia e secagem, em câmara de fluxo laminar, foram distribuídas em número de 50 por placa contendo *Xcm* com 48 horas de cultivo. As sementes, juntamente com a bactéria, foram mantidas por 24 horas nas placas em temperatura de 28 °C \pm 2. Após esse período, foram retiradas das placas e secas em câmara de fluxo laminar. Foram constituídas amostras com diferentes incidências de sementes contaminada, da cultivar Ita 90, misturando-se sementes sem inoculação com sementes inoculadas, sendo a amostra 1 com 100% das sementes inoculadas; a amostra 2 com 50%; a amostra 3 com 25%; a amostra 4 com 10% e a amostra 5 sem contaminação. Na cultivar FMT 709 foi utilizada para a transmissão 100% das sementes com e sem a bactéria. A quantificação do número de UFC/semente foi realizada após o plantio em meio de cultura 523 modificado (BARBOSA, 2007).

Na inoculação a vácuo foram utilizadas sementes da cultivar BRS Ipe que foram imersas em suspensões *Xcm* contendo $2,1 \times 10^7$, $5,2 \times 10^{10}$ e $1,2 \times 10^{13}$ UFC/mL. A amostra foi de 1000 sementes imersas em proporção de 1:1 peso/volume e para o controle negativo as sementes foram imersas em solução fisiológica, na mesma proporção. O processo a vácuo foi de 680 mmHg durante cinco minutos e com liberação lenta, realizada por três ciclos sucessivos. As sementes foram secas em câmara de fluxo laminar e posterior quantificação do número de UFC em meio de cultura e plantio em substrato.

2.2 Quantificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* de sementes inoculadas artificialmente

Para cada método de inoculação foi determinado o número de UFC de *Xcm* nas sementes. As amostras foram de 100 sementes que foram imersas em 50 mL de solução fisiológica, mantidas a 4 °C por 15 horas. A suspensão obtida foi centrifugada por 20 minutos a 3684 xg e o sobrenadante descartado, sendo o extrato diluído em aproximadamente 5 mL da mesma solução, seguindo-se as diluições seriadas. O meio de cultura foi 523 modificado e a incubação foi em estufa a 28 °C durante 48 a 72 horas. Após esse período, as colônias foram contadas para determinar o inóculo presente nas sementes.

2.3 Teste em Plântulas

O plantio das sementes foi em bandejas plásticas contendo substrato comercial (Technomax ®). A umidade do substrato foi

mantida na capacidade de vaso. Para cada forma de inoculação, foram semeadas 400 sementes e mantidas em casa de vegetação com temperaturas médias entre 20 a 32 °C. A umidade ambiental durante o dia foi mantida por meio de sistema de nebulização por 20 segundos a cada hora, de maneira a promover o molhamento foliar.

2.4 Avaliação da transmissão da bactéria das sementes para plântulas

As avaliações da transmissão da bactéria foram por meio da observação dos sintomas da doença em plântulas e das sementes que não germinaram. As plântulas que apresentaram sintomas foram coletadas, levadas ao laboratório para o isolamento da bactéria. As lesões foram observadas ao microscópio para verificar a presença de corrida bacteriana. Após a assepsia superficial da interfase de tecido lesionado e sadio, o material foi macerado em cadinho de porcelana, esterilizado. O isolamento da bactéria foi em meio 523, cujas placas foram setoriadas em dois quadrantes, e o macerado de cada planta, semeado pela técnica de estrias. As bactérias com características de *Xcm* foram purificadas e identificadas.

Para a determinação da transmissão foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem de transmissão} = \frac{\text{Percentagem de plântulas com patógeno}}{\text{Incidência do patógeno na semente}} \times 100$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O inóculo obtido de amostras de 100 sementes inoculadas com *Xcm* por imersão, restrição hídrica e por vácuo, variou de concentrações mais baixas, contendo 40 UFC/mL na amostra 4 por inoculação a vácuo, até a concentração mais alta que foi de $3,1 \times 10^8$ UFC/mL na amostra 6 inoculada por imersão (Tabela 10).

As sementes que foram inoculadas por imersão com diferentes concentrações de *Xcm* apresentaram taxas de transmissão consideradas baixas. Contudo, observa-se que a maior incidência foi quando a concentração de inóculo bacteriano foi mais alta, na amostra 6 (Tabela 10). Mesmo sendo uma cultivar considerada como resistente a mancha angular, (FUZATTO et al., 2011), foi possível verificar os sintomas da doença em folhas de algodoeiro, confirmando os relatos de que algumas raças de *Xcm* são altamente virulentas podendo até romper a resistência da planta. O fato verificado, provavelmente, se deve ao nível elevado de inóculo presente na semente, associados às condições ambientais de temperatura e umidade do substrato e molhamento foliar. Resultados semelhantes foram observados com as demais cultivares, Ita 90 e BRS Ipe, que são consideradas suscetíveis e moderadamente suscetíveis a mancha angular, respectivamente, embora as formas de inoculação fossem diferentes, bem como o inóculo foi menor em algumas amostras, mesmo assim, a taxa de transmissão variou pouco, entre as cultivares e entre as formas de inoculação, sendo as maiores taxas verificadas nas sementes da cultivar Ita 90, inoculada por restrição hídrica.

Independentemente das formas de inoculação da bactéria nas sementes de algodão, os dados de transmissão foram considerados baixos concordando com os dados citados por Schaad (1988). Incidência extremamente baixas entre 0,01-0,03% podem ser suficientes para desenvolvimento de epidemias (NEERGARD, 1977; SCHAAD, 1983). Nesse sentido, amostras de sementes contaminadas com no mínimo 10^3 UFC pode apresentar os níveis de transmissão de 0,01% e nas condições em que o trabalho foi conduzido, mas provavelmente se conduzidos em condições de campo, onde normalmente as temperaturas são mais elevadas e favoráveis à bactéria, desencadearia uma epidemia. Provavelmente em função da susceptibilidade da cultivar Ita 90 à mancha angular, as maiores taxas de transmissão tenham sido maiores conforme verificado na amostra 2 inoculada por restrição hídrica (Tabela 10). Barros et al., (2008) avaliaram oito cultivares de algodão e a cultivar Ita 90 foi a que apresentou mais suscetível a doença. Da mesma forma os autores constataram que a cultivar DeltaOpal sofreu menor ataque da bactéria.

As taxas de transmissão obtidas no presente trabalho foi baixa se relacionada ao alto inóculo nas amostras de sementes (Tabela 10). Esse fato provavelmente está associado a resistência dos cultivares utilizados no estudo, pois conforme estudos conduzidos por Marcano (1994) algumas cultivares de algodão apresentaram 100% de infecção nos cotilédones, a partir de sementes inoculadas com *Xcm*. Em contraste, outras cultivares que apresentaram menor incidência da doença, o que demonstra os diferentes níveis de resistência das cultivares a bacteriose.

Tabela 10. Transmissão de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* de sementes para plântulas

Inoculação	Cultivar	Amostra	Inóculo inicial	UFC/mL de <i>Xcm</i> nas sementes	Germinação (%)	Transmissão (%)
Imersão	DeltaOpal	1	$2,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	80	0,029
		2	$2,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	83	0,037
		3	$2,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	91	0,032
		4	$5,5 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^7$	75	0,033
		5	$9,9 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^7$	87	0,045
		6	$1,3 \times 10^{13}$	$3,1 \times 10^8$	95	0,134
		7	Sol. Fisiol.	S/ <i>Xcm</i>	89	-
Restrição hídrica	Ita 90	1	-	$1,1 \times 10^5$	82	0,12
		2	-	$6,1 \times 10^3$	84	0,15
		3	-	51	82	0,014
		4	-	40	85	-
		5	Sol. Fisiol.	S/ <i>Xcm</i>	86	-
Restrição hídrica	FMT 709	1	-	$1,3 \times 10^4$	91	-
		2	Sol. Fisiol.	S/ <i>Xcm</i>	96	-
Vácuo	Ipe	1	$2,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^3$	92	0,016
		2	$5,2 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^5$	70	0,035
		3	$1,2 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^7$	83	0,021
		4	Sol. Fisiol.	S/ <i>Xcm</i>	79	-

A transmissão de bactérias é altamente dependente do número de bactérias presente nas sementes, e especificamente para a mancha angular do algodoeiro, a faixa de temperatura que acelera o desenvolvimento da mancha angular em algodoeiro é entre 30 a 36 °C, associada ao molhamento foliar (ROBERTS et al., 1996; KIRKPATRIK & ROTHROCK, 2001).

De acordo com Moffett & Wood (1984) a transmissão de *Xcm* de sementes para os cotilédones de algodão foi obtida sob temperaturas em torno de 28 °C e umidade relativa entre 73 e 90%. Entretanto, os autores verificaram maior desenvolvimento da doença em plantas submetidas a 30 °C em relação as que foram mantidas a 25 °C. A presença de população residente da bactéria nas primeiras e segundas folhas verdadeiras, também foi detectada e essa população infecta as folhas mais jovens em períodos chuvosos e sob temperaturas favoráveis. Conforme estes autores, a resistência do hospedeiro é um fator importante na transmissão da bactéria das sementes para as plantas.

As taxas de transmissão obtidas no estudo, mesmo consideradas baixas, são relatadas por alguns autores como o suficiente para desencadear epidemias no campo, influenciadas por características ambientais favoráveis. Nesse sentido estudos a campo são importantes para verificar as reais probabilidades de desenvolvimento de epidemias. Entretanto, as características ambientais da região podem não simular as condições de cultivo da cultura e em função disso, a bactéria pode não expressar o seu potencial de agressividade.

Nesse estudo, foi observado que as plantas de algodoeiro apresentaram grande intensidade de pigmentos vermelhos na haste e folhas. Isso, provavelmente, deve-se a ativação sistemas de resistência da planta contra o patógeno, pois as antocianinas concentram-se nos sítios de infecção de *Xcm* durante as respostas de hipersensibilidade ou de resistência. As células da epiderme que apresentam pigmentação vermelha protegem as células do tecido paliçádico contra a ação nociva da luz solar (EDWARDS et al., 2008; MOHINI et al., 2008).

Theodoro et al. (2011) obtiveram amostras com 1, 2, 5, 10 e 20% de sementes infectadas por imersão com suspensão bacteriana de 10^8 UFC/mL de *Xcm* e não verificaram transmissão da bactéria da semente para planta. Os genótipos de algodão avaliados foram um moderadamente resistente e outro suscetível a mancha angular. As sementes foram plantadas em campo da região de Chapadão do Sul, MT. Os autores levantaram a hipótese de que as condições climáticas não foram favoráveis ao desenvolvimento da doença. Nas safras de 2009/10 as médias de temperaturas foram de 24,4 °C e 29,50 °C, e na safra de 2010/11 ficaram entre 23,10 °C e 28,86 °C.

Em estudos conduzidos com ervilha, a fim de avaliar a transmissão *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, agente causal da mancha bacteriana, verificou-se que o número de lesões nas plantas aumentou a medida que o inóculo nas sementes era maior. Outro fator que interfere no número de lesões é a umidade do solo, apresentando efeito acentuado não só nas infecções primárias, mas também nas infecções secundárias. Em função da influência do número de bactérias nas sementes no desenvolvimento da doença, ressalta-se a

importância dos testes preditivos para determinar a presença das bactérias nas sementes (ROBERTS et al., 1996).

As condições ambientais são tão importantes no desenvolvimento das doenças bacterianas que os sintomas podem ser inibidos, como no caso de *X. c. campestris* em plantas de repolho, quando cultivados em temperaturas entre 15-20 °C. Entretanto, quando a temperatura está na faixa 25-30 °C, os sintomas são muito intensos (ROBERTS et al., 1999).

Na Figura 11, estão representadas lesões características e suspeitas de mancha angular nos cotilédones e folhas de algodoeiro, das quais *Xcm* foi isolada. Vale ressaltar que os sintomas incitados por tal bactéria variam de acordo com a idade da planta e órgãos atacados. Os sintomas primários típicos nos cotilédones das plântulas aparecem como lesões inicialmente encharcadas, de aspecto oleoso que podem evoluir para a necrose dos tecidos. Nas folhas normalmente as lesões aparecem delimitadas pelas nervuras. Com a coalescência das lesões pode ocorrer à rasgadura do limbo foliar (CIA & SALGADO, 2005).



Figura 11. Lesões características de mancha angular em algodoeiro a partir de sementes inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*.

Em meio de cultura semi-seletivo YDC ou 523, as características de bactérias do gênero *Xanthomonas* são colônias amarelas, de aspecto mucóide, bordos lisos e convexos (Schaad et al., 2001). Colônias com tais características foram purificadas em meio de cultura para confirmar o gênero, sendo submetidas algumas provas bioquímicas cujos resultados foram de teste de Gram negativa por

KOH, catalase positiva, oxidase negativa, hidrólise de amido, bem como testes de patogenicidade positivos em plantas de algodão.

Praticamente, todas as bactérias fitopatogênicas são potencialmente transmitidas pelas sementes e o nível de contaminação responsável por epidemias varia. Mesmo em baixas proporções é possível a ocorrência de doenças no campo. Embora, os fatores ambientais, principalmente umidade e temperatura são determinantes para a eficiência do desenvolvimento das doenças bacterianas. Por exemplo, para a podridão negra das crucíferas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a ocorrência de epidemias torna-se comum quando o nível de contaminação das sementes excede 0,03% (SCHAAD, 1988; SCHAAD & FOSTER, 1992). Níveis mais baixos ainda foram verificados por Carmo et al. (1996) em sementes de pimentão com 0,01% de *X. euvesicatoria* de forma que 100% das plantas apresentaram a doença em condições de viveiro, após 30 dias.

Estudos relacionados à taxa de transmissão de *Xcm* para plantas revelam que níveis de 2% de sementes infectadas em uma amostra, podem levar a grandes epidemias no campo (BRINKERHOFF & HUNTER, 1983). A incidência da doença aumenta em situações de safras contínuas em função da presença dos resíduos na lavoura. Conforme Tarr (1961) apud AKELLO & HILLOCKS (2002) incidência de 0,02% doença em plântulas é o suficiente para iniciar uma epidemia nas condições ótimas para desenvolvimento doença e disseminação do patógeno.

A transmissão de *Xcm* de sementes para plantas obtidas neste trabalho não apresentaram grandes diferenças entre as formas de inoculação das sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por

Corrêa et al., (2008) utilizando as inoculações por imersão e por vácuo para contaminar sementes de tomate com *X. vesicatoria*, entretanto houve maior recuperação da bactéria inoculadas por imersão, quando as plântulas foram avaliadas em caixa de gerbox. Os autores relacionaram tal fato ao tempo de exposição das sementes imersas na suspensão, que foi de 24 horas.

As bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes tanto interna quanto externamente (ROMEIRO, 2005). Em relação às sementes de algodão naturalmente infectadas, o procedimento de deslincamento ácido, influencia negativamente a população externa associada, porém, é possível que a população da bactéria localizada internamente, não seja inibida pelo procedimento. Conforme Aaron (2009) a intensidade dos sintomas da mancha angular foi alta, mesmo quando as sementes foram deslincadas com ácido sulfúrico, pois provavelmente a bactéria estava associada internamente a semente e as condições ambientais, favoreceram o desenvolvimento da doença.

Os estudos relacionados à transmissão de bactérias de sementes para plantas dependem de métodos de inoculação das bactérias nas sementes e, a taxa de transmissão, varia conforme cada caso. Por exemplo, a transmissão de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de plantas para semente de feijoeiro variou entre 5,5 a 70% sendo que das seis cultivares avaliadas, três apresentaram a bactéria. Essa bactéria foi detectada nas sementes mediante uso de meio de cultura semi-seletivo (CAMARA et al., 2009). Já, a transmissão de *X. c. campestris* de sementes para plântulas de seis diferentes genótipos de brócolis variaram entre percentagens entre

0,89 e 0,90 e a presença da bactéria não influenciou a qualidade fisiológica das sementes (TELBALDI et al., 2007). Estudos conduzidos por Moura & Romeiro (1993) relatam percentagens de transmissão de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* de sementes de pepino para plantas entre 1,0 a 2,5%.

Sementes infectadas naturalmente por bactérias variam de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta mãe, condições ambientais e severidade da doença, bem como condições e período de armazenamento das sementes, fazem com que haja diferentes concentrações de inóculo da bactéria nas sementes (NEERGAARD, 1977).

4 CONCLUSÕES

Nas condições de condução deste estudo, a transmissão de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* está de acordo com as taxas relatadas por outros autores o que leva a supor que é suficiente para levar ao desenvolvimento de epidemias.

A transmissão da bactéria das sementes para as plântulas, mesmo sob elevadas concentrações de inóculo deve-se provavelmente a resistência dos cultivares ou da virulência da bactéria utilizada no estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de amostras de sementes comerciais para detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* mediante diluição e plaqueamento em meios de cultura semi-seletivos, revelou a presença da bactéria em 21,7% das amostras, porém, a quantificação da bactéria não foi possível por meio dos métodos utilizados nesse estudo.

Os meios de cultura semi-seletivos indicados para a detecção de *Xcm* foram o 523 modificado e o PSA+. Os demais meios de cultura avaliados revelam inconsistência nos resultados, ora apresentando crescimento intenso de contaminantes ou não apresentando crescimento de colônias características de *Xcm*.

Sugere-se outros estudos com diferentes cultivares de algodão para verificar o comportamento das bactérias *Pantoea agglomerans* e *Curtobacterium flaccumfaciens* que foram isoladas das amostras de sementes avaliadas nesse estudo.

Estudos adicionais em relação a estas bactérias devem ser realizados na intenção de verificar a indução de doença em outras cultivares de algodão, assim como estudar a ação de *Pantoea agglomerans* em órgãos como os capulhos. Ainda é interessante verificar a presença destes patógenos em outros lotes de sementes, bem como estudar a possibilidade de transmissão da semente para a planta para verificar se as sementes são fontes de inóculo para estas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON S. A. Isolation frequency of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* from acid delinted and easiflo treated cotton seed. (Thesis in crop science). Texas Tech University, 2009.

AGOSTINI, V.A. *Detecção e biocontrole de Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) FAMV, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS. Setembro, 2004.

AKELLO B., HILLOCKS R.J. Distribution and races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* on cotton (*Gossypium hirsutum*) in Uganda. *Journal of Phytopathology*. v.150, p.65–69, 2002.

ALMEIDA, I. M. G.; BERIAN, L. O. S. et al. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO. Goiânia, GO. 15 a 18 de setembro de 2003.

ALMEIDA, R. P. de; SILVA, C. A. D. da; RAMALHO, F. de S. *Manejo integrado de pragas do algodão*. In: BELTRÃO, N. E. de M.; AZEVEDO, D. M. P. de (Org.). *O Agronegócio do Algodão no Brasil*. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação tecnológica. v. 2, p. 1034-1098, 2008.

AMANN, R., LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Review*. v. 24, p. 555-565, 2000.

ARAUJO & SUASSUNA. *Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar*. EMPRAPA. Versão eletrônica. 2003 Acesso: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/autores.htm>. Janeiro de 2012

AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of

bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*. v. 86, p. 361-366, 1996.

BALANI, D. M. Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares. 2009. 63p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2009.

BARBOSA, J. F. Inoculação e detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) 2007. 135 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BARROS, R.; DEGRANDE, P. E.; SORIA, M. F.; RIBEIRO, J.S.F. Ocorrência de manchas foliares causadas por fungos e bactéria em cultivares de algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*.v. 38, n. 4, p. 297-303, 2008.

BAYSAL, Ö; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*. *Plant Pathology*. v.52, n.6, p.747-753, 2003.

BIRD, L.S.; BRINKERHOFF, L.A.; DAVIS, R.G. Bacterial blight. In: Watkins, G. M. (ed.). Compendium of cotton disease. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. p. 25-28, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRINKERHOFF, L. A. & HUNTER, R. E. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. *Phytopathology*. v.53, p.1397-1401, 1963.

CAMARA, R.C.; VIGO, S.C. & MARINGONI, A.C. Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar. *Journal of Plant Pathology* v. 91, n. 3, p.549-554, 2009.

CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; & CARVALHO, A.O. O progresso da pústula bacteriana do pimentão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, n.1, p. 66-70, 1996.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q. *Diagnose e controle de doenças do algodão*. Cuiabá: UFMT/FAMEV, 55p. 2000.

CHANG, C.J.; DONALDSON, R.; CROWLEY, M. & PINNOW, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*. v.81, p. 449-453, 1991.

CHENG HR & JIANG N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letter*. v.28, p.55-59, 2006.

CHITARRA, L. G. Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* applying fluorescent antibodies and flow cytometry. In: Interactions between Plants and Attacking Organisms, 2000. Abstract Book - Interactions between Plants and Attacking Organisms. Wageningen, 2000. p. 24-24

CHITARRA, L. G.; ARAÚJO, A. E. Mancha angular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 28, p. 173-175, 2003. (Suplemento)

CIA, E. & SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, et al., Manual de fitopatologia: Doenças cultivadas. v.2 Ceres. São Paulo, 1997.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.(Ed.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.42-52. 2005.

COELHO, M. V. S.; GUIMARÃES, P. M.; MARQUES, A.S.A & MARTINS, O. M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*,

murcha bacteriana do feijoeiro e da soja: alto risco de disseminação no Brasil. Embrapa - Comunicado Técnico, 117. p, 1-9. Dezembro, 2004.

CORRÊA, F.M.; CARVALHO, A.O.; CARMO, M.G.F. Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.71-75, 2008.

COSTA, C. & CASTOLDI, F. L. CoStat: um programa para quem pensa que não gosta de estatística. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2009. 384p. Il.

CRUZ, L. M. *Caracterização e Análise Filogenética Molecular de Novos Isolados Fixadores de Nitrogênio*. Curitiba, 2001. 171p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DARRASSE, A.; DARSONVAL, A.; BOUREAU, T.; BRISSET, M. N.; DURAND, K. & JACQUES, M.A. Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. *Applied and Environmental Microbiology*. v.76, n. 20, p. 6787–6796. 2010.

DELANNOY, E.; LYON, B.R.; P. MARMEY, A.; JALLOUL, J.F. DANIEL, MONTILLET, J.L.; ESSENBERG, M.; & NICOLE, M. Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annual Review Phytopathology*. v.43, p.63–82, 2005.

DENARDIN, N. D. et al. *Deteção e identificação de bactérias em sementes*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. João Pessoa, In: Anais. SNA, p.62-67. 2004.

DEZORDI, C. *Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum em sementes de algodão (Gossypium hirsutum L.)*. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

DEZORDI, C.; MARINGONI, A. C.; MENTEN, J.O.M. & CAMARA, R.C. Semi-seletive culture medium for *Xanthomonas*

axonopodis pv. *malvacearum* detection in cotton seeds (*Gossypium hisurtum* L.). *Asian Journal of Plant Pathology*. Botucatu. v.4, n.2, p.128-138, 2010.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J.J. & CRUZ FILHO, J. *Tratamento de sementes - Controle de patógenos*. Viçosa, UFV. Imprensa universitária, 121p. 1980.

EDWARDS, W. R.; JUDY, A.; HALL, A.; ALAN, R.; ROWLAN, A.; TAMA SCHNEIDER-BARFIELD, A.; TZELI JULIA SUN, A.; FATMI M, SCHAAD NW. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* v.78, p. 121–126, 1988.

FREIRE, E.C. et al. *Perdas estimadas na produção de algodão devido a pragas e doenças no Centro-Oeste*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO. Ribeirão Preto – Campina Grande: Embrapa CNPA, p.1-3. 1999.

FUZATTO, M. G.; CIA, E.; KONDO, J. I. Estabilidade fenotípica, um complemento relevante na avaliação e classificação de genótipos de algodoeiro para resistência a doenças. In: *8º Congresso Brasileiro de Algodão & I Cotton Expo 2011*. São Paulo, SP. p.1382-1388, 2011.

GHEZZI, J. I., & T. R. STECK. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecol.* v.30, p.203–208, 1999.

GITAITIS, R. AND WALCOTT, R. The Epidemiology and Management of Seedborne Bacterial Diseases. *Annual Review. Phytopathology*. vol. 45, p.371-397, 2007.

GURTLER, V. & STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region new approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. v.142, p. 3-16, 1996.

GURTLER, V. & STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region new

approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. v.142, p. 3-16, 1996.

HADAS R, KRITZMAN G, KLIETMAN F, GEFEN T, MANULIS. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*. v.54, p.643–649, 2005.

HALFON-MEIRI, A. & VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. *Seed Science & Technology* v. 5, p.129-139, 1977.

HUANG, X.; ZHAI, J.; LUO, Y. & RUDOLPH, K. Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *European Journal Plant Pathology*. v.122, p.461–469, 2008.

HUNTER R.E., BRINKERHOFF L.A., BIRD L.S. Development of a set of Upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* v.58, p.30–32, 1968.

KADO, C.I. & M.G. HESKETT. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* v.60, p.969-975. 1970.

KIRKPATRICK, T. L.; ROTHROCK, C. S. *Compendium of cotton diseases*. 2. ed. USA: APS press, 2001. 77 p.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K. & SANDS, D. C. *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai, Kiadó, 1990. 568p.

KRUPPA, P.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de meio de cultura semi-seletivo para isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de sementes de tomate. *Summa Phytopathologica*. Jaguariúna. v. 20, p.55, 1994, In: Anais. Congressos Paulistas de Fitopatologia, 1994.

LELIS, F. M. V. ; SOUZA, R. M. ; FIGUEIRA, A. R. ; GALVINO, S. B. F. ; GERALDINO, P. S. ; ZACARONI, A. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por PCR utilizando primers específicos. In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia,

2009, Rio de Janeiro. Tropical Plant Pathology Suplemento. Lavras. 2009. v. 34. p. 11-11.

LOPES, L. P.; ALES, P. F. R.; ZANDONÁ, C.; NUNES, M. P.; MEHTA, Y, R. Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolyfluanid. *Summa Phytopathologica*. Botucatu, v. 34, n.3, p. 287-288, 2008.

LOUWS, F.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-Based genomic analysis of phytobacteria: Diversity Detection and Disease Diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol*, v. 37, p. 81-125, 1999.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.). *Patologia de Sementes*. Campinas: Fundação Cargill, p.3-17, 1987.

MACHADO, J.C.; POZZA, E.A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: Zambolim L (Ed.) Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa MG. p. 375-398, 2005.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; DESTÉFANO, S. A. L.; BERIAM; L. O. S.; PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.168-171, 2008.

MARCANO, D. C. A. & URQUIOLA, Y. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* em tecidos secos de algodão. *Agronomía tropical*. v.44, n.4, p. 579-591. 1994.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. *Summa Phytopatologica*. Jaboticabal, v. 23, n. 1/2, p. 160-162, 1997.

MARINGONI, A.C., KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Summa Phytopathologica*, v.20, p.164-167, 1994.

MAUNEY, J.R., STEWART, J.MCD. AND JONES, M.A. (2004) Onset and progression of the “Hollow Seed” (seed rot) malady of South Carolina. In: MEDRANO, E.G. & BELL, A.A. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology* v.102, p.134–143, 2007.

MCDUGALD, D.; RICE S.A.; WEICHART, D. & KJELLEBERG S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, v.25, p.1-9, 1998.

MEDRANO, E.G. & BELL, A.A. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology*. v.102, p. 134-143, 2007.

MENG, X.Q.; UMEXH, K. C.; DAVIS, R. M.; GILBERTSON, R.L. Development of PCR-based assays for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the carrot bacterial leaf blight pathogen, from different substrates. *Plant Disease* v.88, p.1226-1234, 2004.

MENTEN, J.O.M. Situação dos padrões de sanidade de sementes no Brasil. *Summa Phytopathologica*. Botucatu, v.31, Supl. p. 142-147, 2005.

METHA, Y. R.; BIBANCO, K.; ZANDONÁ, C.; LOPES, L.P.; ALVES, P.F.R.; MORAES, M.; AGUIAR, P.; SEQUEIRO, F.; & TATIANE, S.Z. Tolyfluanid como bactericida contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* transmitida por sementes de algodoeiro. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2005, Salvador, *Anais do V Congresso Brasileiro de Algodão, Salvador, 2005*.

METHA, Y. R.; BOMFETI, C. & BOLOGNINI, V. A Semi-Selective Agar Medium to Detect the Presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in Naturally Infected Cotton Seed. *Fitopatologia brasileira*. v.30, n.5, p.489-496, 2005.

MILES A. A. & MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene* v. 38, p.732-749, 1938.

MOFFETT, M.L. & WOOD, B.A. Resident population of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculums for bacterial blight. *Journal of Applied Bacteriology* v.58, n.6, p. 607-612, 1985.

MOHINI, A.; PATIL, A.; MARGARET, L.; PIERCE, A.; GARY FULCHER B.; ALOIS, A.; BELL, C.; MARGARET, E. A. Light filtering by epidermal flavonoids during the resistant response of cotton to *Xanthomonas* protects leaf tissue from light-dependent phytoalexin toxicity. *Phytochemistry*. v.69, p. 2320–2328, 2008.

MORELLO, C.L.; FARIAS, F.J.C.; SILVA FILHO, J.L.; FREIRE, E. C. *Cultivares de algodoeiro para o Cerrado*. Campina Grande: CNPA/EMBRAPA, 2006. 8p. (Circular Técnica, 93).

MOURA, A. B. & ROMEIRO, R. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em amostras de sementes de pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 15, n 2, p. 183-186, 1993.

MOURA, A.B.; CHITARRA, L.G.; SOUZA, R.M. Métodos de detecção de bactérias em sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. v.13, p.297-319, 2005.

NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London: MacMillan Press, 1977. 839p.

NUNES, M.P.; BOLOGNINI, V.; MEHTA, Y.R.; MEHTA, A.; ROSATO, Y.; AGUIAR, P.H.; PIZZINATO, M.A.; CHIAVEGATTO, E.J. Variabilidade genética entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2003, Goiânia. *Anais*. Campina Grande: EMBRAPA – CNPA, 2003.

PINTO, S. P. Comportamento de linhagens e variedades de soja (*Glicines Max.* (L.) Merrill) a uma estirpe de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 2005. 86f. Dissertação. (Mestrado em Fitopatologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2005.

PISA, G. Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de campo belo do sul (sc) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) 2006. Dissertação. (Mestrado em Ciências-Bioquímica) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

RANDHAWA, P.S.; PANNU, S.S. & SCHAAD, N.W. Improved bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. 2001, Salt Lake City, Joint Meeting. APS/MSA/SON p. 25-29, 2001.

RANE, K.K. & LATIN, R. X. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. *Plant Disease*. v. 76, p. 509-512, 1992.

RIBAS, D. A. Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilensis* em plantas de batata através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores a partir de sequências dos genes pnl e rdg. 2007. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROBERTS, S. J. Effect of weather conditions on local spread and infection by pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) *European Journal of Plant Pathology*. v.103, p. 711-719, 1997.

ROBERTS, S. J.; RIDOUT, M. S.; PEACH, L.; BROUGH, J.; Transmission of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) from seed to seedling: effects of inoculum dose, inoculation method, temperature and soil moisture. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 81, p. 65-72, 1996.

ROBERTS, S.J. Effect of soil moisture on the transmission of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) from seed to seedling. *Plant Pathology*. v.41, p. 136-140, 1992.

ROBERTS, S.J.; HILTUNEN, L.H.; HUNTER, P.J. AND BROUGH, J. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica transplants: effects of dose and watering regime. *European Journal of Plant Pathology*. v.105, p.879–889, 1999.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. 2 ed. Viçosa: Dd. UFV, 2005.

ROTH, D.A. Review of extraction and isolation methods. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (eds.). Detection of bacteria in seed and other planting material. St. Paul: APS, p.3-8. 1989.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. *Detection of bacteria in seed and other planting material*. St. Paul: ASP, p.122, 1989.

SCHAAD, N. W. *Detection and identification of bacteria*. In: Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A. Detection of bacteria in seed and other planting material. Minneapolis, APS Press. 2001, 122p.

SCHAAD, N. W. et al. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. ASP:St Paul, 373p. 2001.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K. & B, VIDAVER, A. K. Emended classification of Xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*. v.29, p. 690–695. 2006.

SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. *Xanthomonas*: In: SCHAAD, N. W., ed. Laboratory guide for identification of plant pathogens bacteria. St. Paul, APS Press. n. 2 p. 81-94. 1988.

SCHAAD, N.W.; FORSTER, R.L. A semi-selective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology* v.75, p.260-263, 1988.

SCHNATHORST, W.C. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton plants and its significance in dissemination of the pathogen on seed. *Phytopathology*. v.54, p.1009-1011. 1964.

SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SATTTLER, A.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean. In: SATTTLER, A.W.; ROTH, D.A. (Ed.). Detection in seed other planting material. St. Paul: ASP Press, cap. 4, p. 17-29, 1989.

SILVA, R. R.; STAUDT, R. C.; THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C.; Intensidade da mancha-angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, na região de Chapada do Sul – Safra 2007/08. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2009, Foz do Iguaçu. Anais do VII Congresso Brasileiro do Algodão. Campina grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 1061-1068.

SOARES, J. Desenvolvimento de meio semi-seletivo para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. 2006. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

TEBALDI, N.D, PANIZZI, R. C., SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.4, p.416-418, 2007.

TEIXEIRA, H., MACHADO J.C., ORIDE, D., ALVES, M.C. & NODA, A. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. *Fitopatologia Brasileira*. v. 30, p.109-114. 2005.

THEODORO, G. F.; CORREIA, H.C. & CHUMPATI A. A. Avaliação da transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* via semente-algodoeiro em condições de campo, no cerrado sul-mato-grossense. *Bioscience Journal*. Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 701-705, 2011.

TUMELERO, A. I.; DENARDIN, N. D. Uso de Polímeros em Formulações para Preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.58-61, 2008.

VALARINI, P. J., MENTEN, J. O. M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. *Fitopatologia Brasileira*. v.17, p. 373-383. 1992.

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. *Fitopatologia Brasileira*. v.17, p.373-383, 1992.

VAN VUURDE, J. W. L. *Detection of Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. ISTA/ISHI. Canadá. 1999.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.472-489, 1995.

VIVIAN, A. Identification of plant pathogenic bacteria using nucleic acid technology. In: Duncan; Torrance. *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. BSP. 1992.

WOO, P. C. Y.; TENG, J.L. L.; WU, J.K. L.; LEUNG, F. P.S.; TSE H.; FUNG, A.M.Y.; LAU, S.K.P. & YUEN, K. Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. v. 58, p.1030-1036, 2009.

WOODSON, S.A.; LEONTIS, N.B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. *Curr Opin Struct Biol*, v. 8, n. 3, p. 294-300, 1998.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Agrobacterium undicola* de Lajudice et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Internacional Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, v. 51r, p. 89-103. 2001.

ZACHOWSKI, A. & RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) from Nicaragua. *Journal of Phytopathology*, v. 123, p. 344-352, 1988.

ZANDONÁ, C., MEHTA, Y.R., SCHUSTER, I., ALVES, P.F.R., BOMFETI, C.A., BIBANCO, K.P., SILVA, R.B. & LOPES, L.P. Mecanismo genético de resistência em três cultivares de algodoeiro a

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum*. *Fitopatologia Brasileira* v.30, p.647-649, 2005.

ZHAI, J.; LUO, Y.; ZHEN, D.; HUANG, X. Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. *Jornal of phytophatology*. v. 158, p. 764–768, 2010.

ANEXOS

MEIO 523 (Kado & Heskett, 1970)

Extrato de levedura.....	4,0g
Sacarose	10,0g
Caseína ácida hidrolizada.....	8,0g
K ₂ HPO ₄	2,0g
MgSO ₄	0,3g
Ágar	
Água destilada.....	1000 mL

MEIO 523 modificado (Barbosa, 2007)

Manitol.....	30,0g
Extrato de levedura.....	4,0g
Caseína ácida hidrolizada.....	8,0g
K ₂ HPO ₄	2,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,15g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000 mL

Após a autoclavagem adicionar: 50 mg de cefalexina, 50 mg de cefadroxil, 10 mg de clorotalonil e 300 µL de triadimenol

MEIO MSS (Dezordi, 2006)

Extrato de carne.....	3,00g
Peptona.....	5,00g
Amido solúvel.....	10,00g
CaCl ₂	0,25g
Ágar.....	15,00g
Solução cristal violeta (1%).....	150 µL
Água	944mL

Adicionar após a autoclavagem: 5 mL de tween 80 + 25mL de água destilada (esterilizado); 50 mg de cephalaxina (500 mg/100mL de água destilada e esterilizada); 10 mg de clorotalonil; 10 mg de tiofanato metílico (cercobin 700PM em 100 mL de água destilada e esterilizada).

MEIO PSA+ (Metha, et al., 2005)

Ca (NO ₃).....	0,35g
Fe SO ₄ (Sulfato de ferro)	0,35g
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio).....	1,4g
Peptona.....	3,5g
Sacarose.....	14,0 g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000 mL

pH = 6,8. Após a autoclavagem adicionar as soluções: **Soluções:** Ciclohexamida (Sigma) 100mg – (1 mL de solução estoque 500mg em 10 mL de álcool 75%); Cephalexina (Sigma) 10mg – (1mL de solução estoque 100mg em 10 mL de álcool 75%); Pencycuron (Monceren-Bayer) = 0,03g – direto no meio Triadimenol (Baytan-Bayer) = 0,714mL; Tolyfluanid (Euparen 500PM, Bayer S.A.) - (1 mL de solução estoque de 0,125g em 10mL de água esterilizada)

NUTRIENTE ÁGAR MODIFICADO (NA+)

Meio caldo nutriente.....	8,0g
Sacarose	5,0g
Amido solúvel	2,0g
Ciclohexamida	0,02g
Ágar	15,0g
Água destilada.....	1000 mL

MEIO MSXM (Soares & Denardin, 2006)

Dextrose	10,0g
Extrato de levedura.....	10,0g
Amido	10,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Ágar	15,0g
Ampicilina	10 mg
Cefalexina	50 mg
Ciclohexamide.....	200 mg

Solução estoque dos antibióticos:

Dissolver a ampicilina 1000 mg em 20mL de água destilada esterilizada; diluir uma cápsula de 500 mg de cefalexina em 10 mL de água destilada e esterilizada; diluir 1g de ciclohexamide em 5 mL de etanol a 70%. Manter os estoques em geladeira em frascos âmbar ou passar papel alumínio.